

**Reagenzien zur Modifikation von Biopharmazeutika,
deren Herstellung und Anwendung**

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, welche zur Kopplung an Pharmazeutika, insbesondere Biopharmazeutika geeignet sind, sowie Konjugate aus den Verbindungen mit Biomolekülen oder pharmazeutischen Wirkstoffen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen können auf einfache Weise durch Mehrkomponentenreaktionen gebildet werden. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung der Konjugate als verbesserte Formulierung von Pharmazeutika sowie deren Herstellung. Ferner stellt die Erfindung einen Labor Kit zur *in vitro* Herstellung von Konjugaten aus den erfindungsgemäßen Verbindungen und Pharmazeutika sowie biotechnologischen Substanzen, insbesondere Biopharmazeutika, pharmazeutischen Wirkstoffen, synthetischen Molekülen oder Oberflächen zur Verfügung.

Die Entwicklung von Biopharmazeutika als Arzneistoffe oder für potentielle Arzneistoffe sowie biotechnologischer Produkte für die Anwendung im Bereich Proteomics oder technischen Bereich machte in den vergangenen Jahrzehnten sprunghafte Fortschritte, die durch mehrere Faktoren entscheidend beeinflusst wurden:

- a) verbesserte Isolierungs- und Reinigungstechniken,
- b) die revolutionären Entwicklungen in der Gentechnologie und damit verbunden die Möglichkeit zur Herstellung rekombinanter Proteine,
- c) das bessere Verständnis der Biochemie sowie der Wirkmechanismen von Biopharmazeutika und
- d) die Erschließung neuer Anwendungsgebiete und Methoden für biotechnologische Produkte.

Die Effektivität und die Dauer der Wirkung eines Wirkstoffs werden durch sein pharmakologisches Profil bestimmt. Besonders bei Biopharmazeutika wird sehr oft *in vivo* ein schneller Wirkungsverlust beobachtet, was allgemein als „clearance“ bezeichnet wird. Die clearance erfolgt durch Prozesse wie Verstoffwechselung bzw. Metabolisierung, renale Ausscheidung und durch

die Reaktion des Immunsystems auf die körperfremde Verbindung. Gerade proteinogene Wirkstoffe, eine wichtige Gruppe von Biopharmazeutika, rufen bei deren therapeutischem Einsatz eine starke Immunantwort hervor, die bis zum allergischen Schock führen kann. Solche nachteiligen Effekte verhindern in vielen Fällen den kommerziellen bzw. therapeutischen Einsatz dieser sonst sehr vorteilhaften Wirkstoffklasse.

Wissenschaftler beschäftigen sich seit vielen Jahren damit, Strategien zu entwickeln, den therapeutischen Einsatz von Biopharmazeutika dennoch zu ermöglichen. Eine der ersten Methoden war die Änderung der Oberflächenladung durch Umsetzung von Proteinen mit Bernsteinsäureanhydrid. Diese Modifikation wird als Succinylierung bezeichnet (Habeeb, A.F.S.A. Arch. Biochem. Biophys. 1968, 121, 652). Eine kovalente Bindung einer biologisch aktiven Verbindung an verschiedene Polymere stellt eine der erfolgreichsten Strategien der letzten Jahre dar und wurde zu einer der wichtigsten Methoden zur Verbesserung der pharmakologischen und toxikologischen Eigenschaften von biopharmazeutischen Wirkstoffen. Eines der am häufigsten verwendeten Polymere ist hierbei das Polyalkylenoxid Polyethylenglykol, kurz PEG genannt.

Abuchowski, einer der Pioniere auf dem Gebiet der polymervermittelten Darreichung von Biopharmazeutika, konnte zeigen, dass eine kovalente Kopplung von Polyethylenglykolketten an ein Polypeptidmolekül einen positiven pharmakologischen Effekt bei diesem Wirkstoff erzeugt. Ein solches Konjugat zeichnet sich durch eine verminderte Immunogenität und eine verlängerte Halbwertszeit im Blut aus (US-Patent Nr. 4 179 337, Davis et al.; Abuchowski & Davis „Enzymes as Drugs“, Holcemberg & Roberts, Hrsg. John Wiley & Sons, N.Y. 1981, 367-383). Ferner hat die Modifikation biotechnologischer Produkte, wie z.B. Enzyme, häufig Einfluss auf weitere biochemische Parameter, z.B. auf deren pH- und Thermostabilität. Eine Modifikation kann deshalb z.B. für technische Enzyme zum Einsatz in Waschmitteln aufgrund einer erhöhten Thermostabilität oder für Biopharmazeutika im Hinblick auf eine orale Verabreichung aufgrund einer erhöhten pH-Stabilität vorteilhaft sein.

Die oben beschriebenen Arbeiten beschleunigten massiv die Forschung auf

dem Gebiet der Konjugation von Wirkstoffen mit dem Polymer Polyethylenglykol. Die Modifikation mit Polyethylenglykol bietet auch bei herkömmlichen kleinen Wirkstoffen einige Vorteile. Die kovalente Bindung eines kleinen Wirkstoffs an das hydrophile Molekül Polyethylenglykol erhöht
5 die Löslichkeit des Konjugates und kann außerdem die Toxizität verringern (Kratz, F. et al. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1999, 7, 2517-2524). Die wichtigsten Übersichtsartikel zur Konjugation mit Polyethylenglykol sind im Folgenden benannt: Greenwald, R.B., J. of Controlled Release 2001, 74, 159-171; Zalipsky, S. Advanced Drug Delivery Reviews, 1995, 16, 157-182;
10 Zalipsky, S. Bioconjugate Chem. 1995, 6, 150-165; N. K. Jain, N.K.; et al. Pharmazie 2002, 57, 5 – 29.

Die chemische Reaktion zur Kopplung eines Polyethylenglykolmoleküls an ein Biopharmazeutikum erfordert die Aktivierung einer der beiden
15 Komponenten, die zur Reaktion gebracht werden. Im Regelfall wird hierzu das PEG-Molekül mit einem Verbindungsmolekül, dem so genannten aktivierten Linker versehen. Zur Aktivierung steht die gesamte Breite der lange etablierten Peptidchemie zur Verfügung. Zur Modifikation von Aminofunktionalitäten, meist von Lysinresten als Baustein einer biologisch
20 aktiven Verbindung, wird der Linker häufig in Form eines N-Hydroxysuccinimid Aktivesters aktiviert. Harris, J.M. et al. (US-Patent Nr. 5,672,662) entwickelte diese Methode für Propion- und Buttersäurelinker, während bei Zalipsky, S. et al. (US-Patent Nr. 5,122,614) ein aktiver Kohlensäureester zum Einsatz kommt. Die Reaktion eines Lysinrestes mit
25 einem solchen aktivierten Linker führt zur Bildung einer Amid- bzw. Urethanbindung. Die Verknüpfung eines PEGs mit einem Biopharmazeutikum, PEGylierung genannt, führt in manchen Fällen zum Verlust der biologischen Aktivität. Ein Grund dafür kann der Verlust der positiven Ladung durch die Bildung einer Amidbindung am Lysinrest sein.

30 Die reduktive Aminierung unter Verwendung von PEG-Aldehyden stellt eine gute Alternative zu der Verwendung von Aktivestern dar (Harris, J.M. US-Patent Nr. 5,252,714), weil diese Kopplungsmethode zur Bildung eines sekundären Amins unter Erhalt der positiven Ladung führt. Weitere
35 Kopplungsmöglichkeiten bestehen in der Verwendung der Maleimidmethode (Cysteinreste) und der direkten Verbindung ohne eine Linkergruppe beim Einsatz von Tresyl- oder Halogenverbindungen.

Bei den am häufigsten verwendeten PEGs handelt es sich um lineare Monomethoxypolyethylenglykol-Ketten (m-PEGs). Diese linearen Ketten sind konformativ nicht eingeschränkt und können sich je nach Umgebung frei drehen. Folglich ist die von den Ketten abgeschirmte Oberfläche des Biopharmazeutikums relativ gering. Um die Oberflächenabschirmung zu verbessern, werden verzweigte Modifizierungsreagenzien entwickelt, die mehrere PEG-Ketten in einem Molekül enthalten. Von dieser Substanzklasse gibt es nur wenig kommerzielle Beispiele. Ein bekanntes Beispiel dafür ist ein mit zwei m-PEG-Ketten versehnnes, aktiviertes Lysin. Aufgrund der auch hier vorhanden freien Drehbarkeit der Bindungen, ist der Abschirmeffekt jedoch nur mäßig (Veronese, F.M. Bioconjugate Chem. 1995, 6, 62-69).

Obwohl die PEGylierung schon sehr weit entwickelt ist, bleiben noch einige entscheidende Nachteile bestehen:

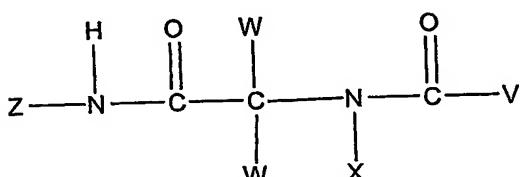
- a) die Modifikation von Biopharmazeutika führt in vielen Fällen zu einem dramatischen Abfall der biologischen Aktivität,
- b) Polymere, wie Polyethylenglykol, liegen aus Prozessgründen als komplexes Gemisch verschiedener Molekulargewichte vor, was als Polydispersität bezeichnet wird und häufig zu Problemen bei der Reproduzierbarkeit bzw. Qualität führt,
- c) in Abhängigkeit von der Qualität des m-PEGs und der Art der Aktivierung kommt es in einigen Fällen zu unerwünschten Quervernetzungsreaktionen,
- d) die Optimierung der Reaktionsbedingungen, die Abschätzung des pharmakologischen Effekts und die Wahl des richtigen Modifizierungsreagenzes sind schwierig und zeitaufwendig und
- e) die Modifizierung von Biopharmazeutika mit Polymeren, wie z.B. Polyethylenglykol, ist bis heute Speziallabora vorbehalten.

Aufgrund der beschriebenen Defizite beim Stand der Technik gibt es einen großen Bedarf an Modifizierungsreagenzien mit neuen, variablen Eigenschaften, deren Anwendung zu entscheidenden Verbesserungen bei biotechnologischen sowie auch bei herkömmlichen, synthetischen Produkten führt. Ferner wäre es wünschenswert, diese Technologie auch Anwendern zugänglich zu machen, die nicht über eigene, spezielle Laborausstattungen

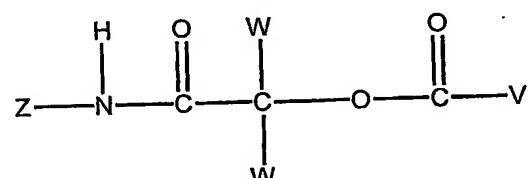
verfügen bzw. keinen Zugriff auf Speziallabor haben.

Eine Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, Verbindungen bereitzustellen, welche an Biopharmazeutika gebunden werden können und mit denen die Nachteile von Biopharmazeutika-Konjugaten des Standes der Technik zumindest teilweise überwunden werden können. Eine weitere Aufgabe bestand darin, einen Labor Kit zur Verfügung zu stellen, der es jedem geneigten Wissenschaftler ermöglicht, eine Substanz mit Polymeren, wie z.B. Polyethylenglykol, zu modifizieren.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Bereitstellung von Verbindungen der Formel (Ia/b)



Formel (Ia)



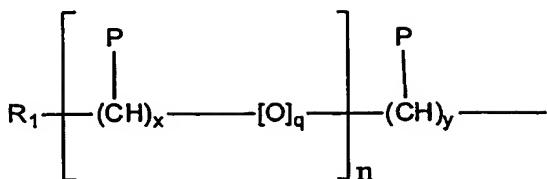
Formel (Ib)

gelöst, wobei Verbindungen der Formel (Ia) mittels einer Ugi-Reaktion und der Formel (Ib) mittels einer Passerini-Reaktion hergestellt werden können

und

worin

die Reste V, W, X und Z jeweils unabhängig voneinander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher Heteroatome enthalten kann oder/und V, W, oder/und X Wasserstoff darstellen, dadurch gekennzeichnet, dass wenigstens einer der Reste V, W, X oder/und Z eine Bindegruppe Y trägt und dass die Reste V, W, X und Z zusammen mindestens eine Gruppe der Formel (II)



Formel (II)

aufweisen, worin

P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, C₁-C₄-Alkyl, O-R₂ oder CO-R₃

5 darstellt,

R₁ H, OH oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist, welcher Heteroatome, insbesondere O oder/und N, enthalten kann,

R₂ bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 C-Atomen darstellt,

10 R₃ OH oder NR₄R₅ ist,

R₄ und R₅ jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest, welcher Heteroatome, insbesondere O oder/und N, enthalten kann, darstellen, wobei R₄ und R₅ zusammen auch ein Ringsystem bilden können,

n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und

15 x bei jedem Auftreten eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und

y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und

q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen ein Grundgerüst auf, welches durch eine Mehrkomponentenreaktion, beispielsweise eine Ugi- oder eine Passerini-Reaktion bzw. durch eine stufenweise durchgeführte Ugi-Reaktion erhältlich ist. Bei einer stufenweise durchgeführten Ugi-Reaktion werden zunächst drei Komponenten miteinander umgesetzt (Amin-, Isonitril- und Carbonylkomponente) und an das Reaktionsprodukt dann die vierte Komponente (Säurekomponente) gekoppelt. Durch Verwendung einer solchen Mehrkomponentenreaktion ist es möglich, bei Auswahl geeigneter Ausgangsverbindungen gezielt funktionelle Gruppen auf einfache Weise in einem Molekül bereitzustellen. Die erfindungsgemäßen Verbindungen enthalten als funktionelle Gruppe wenigstens eine Bindegruppe Y, welche eine kovalente Bindung der erfindungsgemäßen Verbindung an weitere Moleküle, insbesondere an biotechnologische, pharmazeutische oder synthetische Wirkstoffe, sowie an Oberflächen oder an Biokatalysatoren ermöglicht. Bei der Bindegruppe Y handelt es sich bevorzugt um eine

Verbindung, welche mit einer in dem zu koppelnden Wirkstoff vorliegenden funktionellen Gruppe kovalent binden kann, beispielsweise um eine Bindegruppe, die mit einer Aminogruppe, einer Thiolgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Guanidingruppe, einer Carbonylgruppe, einer Hydroxylgruppe, einem Heterozyklus, insbesondere mit N als Heteroatom (z.B. in Histidinresten), einer C-nukleophilen Gruppe, einer C-elektrrophilen Gruppe, einem Phosphat, einem Sulfat oder ähnlichem bindefähig ist. Möglich sind auch nicht kovalente Bindungen, z.B. Chelate, Komplexe mit Metallen, z.B. an Oberflächen oder mit Radioisotopen sowie Bindungen an Silicium-haltige Oberflächen. Geeignete Bindegruppen sind beispielsweise eine Carbonsäure oder eine aktivierte Carbonsäuregruppe.

Zur späteren Kopplung der Verbindung an ein biotechnologisches oder synthetisches Produkt sowie an Naturstoffe und technische Produkte enthalten die erfindungsgemäßen Verbindungen bevorzugt eine aktivierte Funktionalität Y. In der aktivierte Form ist Y bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt, die aus (O-alkyl)₂, -OSO₂CH₂CF₃ (Tresyl), (O-aryl)-Azide, -CO-Q, Maleimidyl, -O-CO-Nitrophenyl oder Trichlorphenyl, -S-S-Alkyl, -S-S-Aryl, -SO₂-Alkenyl (Vinylsulfon), -Halogen (Cl, Br, I) besteht, wobei Q unabhängig aus einer Gruppe ausgewählt ist, die aus H, O-Aryl, O-Benzyl, O-N-Succinimid, O-N-Sulfosuccinimid, O-N-Phthalimid, O-N-Glutarimid, O-N-Tetrahydrophthalimid, N-Norbornene-2,3-dicarboximid, Hydroxybenzotriazole und Hydroxy-7-azabenzotriazole besteht. Bevorzugt handelt es sich bei Y um eine Gruppe -CO-Q. Eine gute Übersicht über mögliche Aktivierungen bietet der Review von Zalipsky, S. erschienen in Bioconjugate Chem. 1995, 6, 150-165.

Durch die Gruppe Y können die erfindungsgemäßen Verbindungen kovalent an Wirkstoffe gebunden werden und somit höchst wünschenswerte, stabile Konjugate bilden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen weisen weiterhin mindestens eine Gruppe der Formel (II) auf. Bevorzugt weisen die Verbindungen mindestens zwei und noch mehr bevorzugt drei Gruppen der Formel (II) auf. Aufgrund der durch die Mehrkomponentenreaktion bereitgestellten Flexibilität ist es möglich, die Gruppen der Formel (II) an verschiedenen Positionen im Molekül einzufügen. So ist es möglich, Gruppen der Formel (II) in

verschiedenen Resten V, W, X oder/und Z, insbesondere in X oder/und Z, einzuführen. Auf diese Weise ist es möglich, eine Verbindung bereitzustellen, welche mehrere und insbesondere eine große Anzahl an Gruppierungen der Formel (II) enthält, welche einem Konjugat aus 5 Verbindung der Formel (I) und einem Wirkstoff insbesondere eine verminderte Immunogenität, eine verlängerte Halbwertszeit im Körper, eine höhere Proteolysestabilität, eine Erhöhung der Löslichkeit, eine Verringerung der Toxizität, eine verbesserte pH-Stabilität sowie eine erhöhte Thermostabilität verleihen.

10 Alternativ oder zusätzlich ist es auch möglich, in einem der Reste V, W, X oder/und Z, insbesondere X oder/und Z, mehrere Gruppen der Formel (II), bevorzugt zwei Gruppen der Formel (II) einzufügen.

15 Insbesondere ist es erfindungsgemäß möglich, eine gute Abschirmung durch eine oder mehrere kurzkettige Gruppen der Formel (II) zu erreichen, wobei kurzkettige Gruppen der Formel (II) mit gleicher Kettenlänge mit guter Reproduzierbarkeit erhalten und eingeführt werden können. Alternativ ist es 20 auch möglich, gleichzeitig Gruppen der Formel (II) mit unterschiedlichen Kettenlängen einzuführen. Ferner ist es auch möglich, polydisperse Gruppierungen der Formel (II) einzusetzen.

Erfindungsgemäß wurde festgestellt, dass eine gute Abschirmung von an 25 erfindungsgemäße Verbindungen gekoppelten Wirkstoffen bereits erreicht werden kann, wenn die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel (I) ein Molekulargewicht von 200 bis 50.000 Da, insbesondere 1.000 bis 20.000 Da aufweist. Ferner wurde festgestellt, dass erfindungsgemäße Verbindungen der Formel (I), die mehr als eine Kette der Formel (II) enthalten, bereits bei geringeren Molekulargewichten der gesamten Verbindung eine gute 30 Abschirmung bewirken. Bei Verbindungen, welche zwei bis drei Gruppierungen der Formel (II) aufweisen, ist bereits ein Molekulargewicht der gesamten Verbindungen von 500 bis 25.000 Da, insbesondere von 500 bis 10.000 Da ausreichend. Verbindungen welche vier oder fünf Gruppierungen der Formel (II) aufweisen, weisen bevorzugt ein 35 Molekulargewicht von 200 bis 12.500 Da, insbesondere von 500 bis 7.500 Da auf. Bei Verbindungen, welche sechs oder mehr Gruppierungen der Formel (II) enthalten, beträgt das Molekulargewicht besonders bevorzugt ≤

7.500 Da und noch mehr bevorzugt \leq 5000 Da.

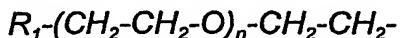
Die Gruppen der Formel (II) stellen bevorzugt Polyalkylenoxide, wie beispielsweise Polyethylenglykol, Polyolefinkohole, wie beispielsweise 5 Polyvinylalkohol oder Polyacrylmorpholin dar.

In den Gruppen der Formeln (II) können die Reste bzw. Platzhalter P, R₂, R₃, R₄, R₅, n, x, y sowie q in einem Molekül bzw. einem Rest jeweils gleich oder auch unabhängig voneinander unterschiedlich sein. So kann der Rest der 10 Formel (II) beispielsweise ein aus Polyethylenoxid- und Polypropylenoxidgruppen bestehendes Polyalkylenoxid sein.

Für P = CO-R₃ handelt es sich um Polyacrylsäuregruppierungen (R₃ = OH) bzw. Polyacrylamide (R₃ = NR₄R₅). R₄ und R₅ können dabei Wasserstoff oder 15 einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 30 C-Atomen, insbesondere 1 bis 10 C-Atomen, mehr bevorzugt 1 ist 6 C-Atomen darstellen, welcher Heteroatome enthalten kann, insbesondere ein oder mehrere Heteroatome, ausgewählt aus O, N, P und S. Die Reste R₄ und R₅ können zusammen auch einen Ring bilden, beispielsweise einen Morphinring.

20 Bei dem Rest R₁ handelt es sich um Wasserstoff, Hydroxy oder einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen, mehr bevorzugt 1 bis 30 Kohlenstoffatomen und am meisten bevorzugt 1 bis 10 Kohlenstoffatomen, welcher gegebenenfalls Heteroatome, insbesondere O, 25 N, S, P oder/und Si, enthalten kann. Der Rest R₁ kann gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sowie linear, verzweigt oder zyklisch sein. Besonders bevorzugt ist R₁ HO, CH₃-O, CH₃-(CH₂)_a-O, (CH₃)₂CH-O, wobei a eine ganze Zahl zwischen 1 und 20 ist. R₁ kann weiterhin bevorzugt ausgewählt werden aus einem Acetal, z.B. (CH₃O)₂- und (CH₃-CH₂O)₂-, einem Aldehyd, z.B. OHC-CH₂-O-, einer Alkenylgruppe, z.B. CH₂=CH-CH₂-O-, einem Acrylat, z.B. CH₂=CH-CO₂-, oder einem Methacrylat, z.B. CH₂=C(CH₃)-CO₂-, einem Acrylamid, z.B. CH₂=CH-CONH-, einer 30 Aminoalkylgruppe, z.B. H₂N-CH₂-CH₂-, einer geschützten Aminoalkylgruppe, z.B. A-NH-CH₂-CH₂-, wobei A eine Schutzgruppe darstellt, insbesondere N-Acyl, N-Sulfonyl, N-Silylschutzgruppen, wie z.B. tert. Boc-, Alloc-, Fmoc, Tr-, Z-, Moz-, einer Thioalkylgruppe HS-CH₂-CH₂-, oder einer geschützten 35 Thioalkylgruppe.

Bevorzugt weist die Gruppierung der Formel (II) die Formel (IIa)



Formel (IIa)

5

auf, wobei n zwischen 0 und 1000 ist.

n (wie hierin verwendet, z.B. in Formel II oder Formel IIa) ist bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 0 bis 1000, mehr bevorzugt von 10 1 bis 500, noch mehr bevorzugt von 2 bis 250, insbesondere mindestens 3 und am meisten bevorzugt mindestens 4 bis 50. Erfindungsgemäß ist es möglich, Verbindungen mit einer großen Anzahl an Gruppierungen der Formel (II) bereitzustellen, bevorzugt mit mindestens 2, insbesondere mindestens 3, bevorzugt mindestens 4, mehr bevorzugt mindestens 5 und am meisten bevorzugt mindestens 9 Gruppierungen der Formel (II). Oftmals sind jedoch bereits Verbindungen besonders bevorzugt, welche 2 oder 3 Gruppierungen der Formel (II) enthalten.

20 x ist bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 10, insbesondere 1 bis 6, mehr bevorzugt von 2 bis 3 und y ist eine ganze Zahl von 0 bis 50, mehr bevorzugt von 1 bis 10, noch mehr bevorzugt von 2 bis 6. q ist bei jedem Auftreten unabhängig voneinander 0 oder 1.

25 Die Reste V, W, X und Z stammen aus den bei der Multikomponentenreaktion umgesetzten Edukten bzw. werden, für den Fall, dass eines der Edukte zwei oder mehr funktionelle Gruppen (Amin-, Keton- bzw. Aldehyd-, Isonitril- oder Säuregruppierung) aufweist, im Verlauf der Multikomponentenreaktion aufgebaut. Bevorzugt sind Verbindungen, die bei einer Mehrkomponentenreaktion oder einer mehrstufigen 30 Mehrkomponentenreaktion, insbesondere einer Vierkomponentenreaktion und am meisten bevorzugt bei einer Ugi-Reaktion erhalten werden, in der wenigstens ein Edukt eingesetzt wird, welches verzweigt ist, d.h. wenigstens zwei, mehr bevorzugt wenigstens drei in der Mehrkomponentenreaktion reaktive Gruppierungen (z.B. Amin-, Carbonyl-, Isonitril- oder/und 35 Säuregruppierung) aufweist.

Bei Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen mittels einer Ugi-Reaktion stammt der Rest V aus der Säurekomponente, der Rest Z aus der Isonitrilkomponente, der Rest X aus der Aminokomponenten und der Rest W aus der Carbonylkomponente.

5

Die Reste V, W, X und Z stellen jeweils unabhängig voneinander Wasserstoff oder einen Kohlenwasserstoffrest dar, welcher gegebenenfalls Heteroatome enthalten kann. Ein Kohlenwasserstoffrest bedeutet hierin, soweit nicht explizit anders angegeben, einen Rest mit 1 bis 100.000 C-

10 Atomen, mehr bevorzugt einen Rest von 1 bis 10.000 C-Atomen, in einigen bevorzugten Fällen 1 bis 50 C-Atomen, welcher 0 bis 10.000, mehr bevorzugt 1 bis 1.000 Heteroatome enthalten kann, beispielsweise ausgewählt aus O, P, N oder S. Die Kohlenwasserstoffreste können linear oder verzweigt sein und gesättigt oder ein- oder mehrfach ungesättigt sein.

15 Ein Kohlenwasserstoffrest kann auch zyklische oder aromatische Abschnitte enthalten. Bevorzugte Kohlenwasserstoffreste sind Alkyl, Cycloalkyl, Alkenyl, Cycloalkenyl, Alkinyl, Cycloalkinyl, Aroyl sowie Heteroaryl. Ein Kohlenwasserstoffrest, wie hierin verwendet, kann aber auch funktionelle Gruppen und insbesondere ein Targeting-Agens enthalten und beispielsweise einen Aminocarbonsäureester, beispielsweise einen gesättigten oder ungesättigten Omega-Aminocarbonsäureester, einen Farbstoff, einen Fluoreszenzmarker, ein Antibiotikum, einen Minor oder Major Groove Binder, einen Biotinylrest, einen Streptavidinrest, einen intercalierenden Rest, einen alkylierenden Rest, ein Steroid, ein Lipid, ein Polyamin, Folsäure, einen Rezeptoragonisten oder -antagonisten, einen Enzyminhibitor, ein Peptid, einen Antikörper oder ein Antikörperfragment, einen Aminozucker, ein Saccharid oder Oligosaccharid, z.B. Galactose, Glucose oder Mannose, ein Antisenspolymer, eine modifizierte Oberfläche, ein grenzflächenaktives Agens oder ein komplexierendes Agens umfassen.

25

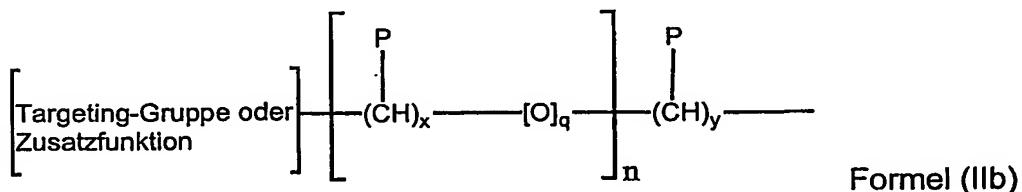
30 In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst wenigstens einer der Reste V, W, X oder/und Z eine Targeting-Gruppierung, die das zielgerichtete Dirigieren der erfindungsgemäßen Verbindungen und insbesondere von den erfindungsgemäßen Verbindungen enthaltenden Konjugaten an einen gewünschten Zielort, beispielsweise einen Ort einer Erkrankung, wie einen Entzündungsherd oder ein Krebsgeschwür ermöglicht. Als Targeting-Gruppierung können z.B. Folat, Biotin, Mannose, Maltose, Succinat,

Aconitat, Dexamethason, Alkylglycoside, Glykoside und Peptide, z.B. mit Arg-Gly-Asp Motiv, dienen.

5 Erfnungsgemäß ist es auch möglich, Moleküle bereitzustellen, welche zwei oder mehr Targeting-Gruppierungen enthalten. Dadurch kann eine erhöhte Targeting-Wirkung erzielt werden oder/und die Verbindung bzw. ein damit gebildetes Konjugat an mehrere gewünschte Stellen dirigiert werden.

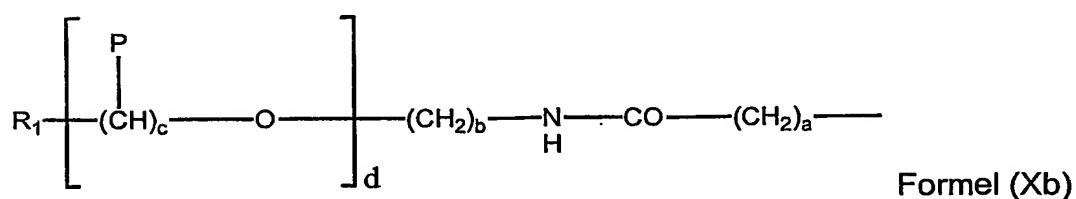
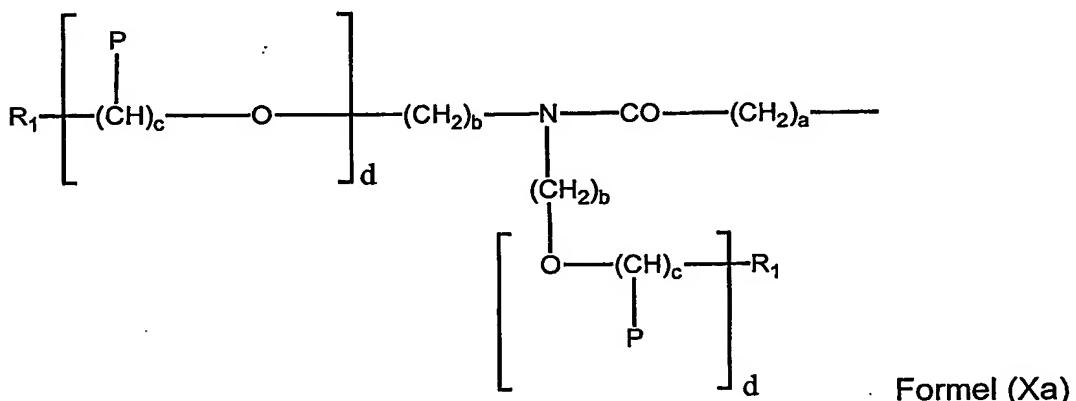
10 Weiterhin können die erfungsgemäßen Verbindungen auch Reportergruppierungen enthalten, beispielsweise Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzmarker, welche eine Anwendung für diagnostische Zwecke ermöglicht.

15 Bei dem Rest X in den erfungsgemäßen Verbindungen (der Rest, der in einer Ugi-Reaktion durch die Verwendung eines primären Amins $X-NH_2$ eingeführt wird) handelt es sich bevorzugt um eine Targeting-Gruppierung, um einen Rest der Formel (II) oder eine Kombination aus beiden. Besonders bevorzugt ist dabei $x = 2, 3$ oder 4 . Besonders bevorzugte Untereinheiten im Rest X sind Ethylenglykol, Propylenglykol, Butylenglykol oder Kombinationen davon mit einer Kettenlänge von 3 bis 500 , insbesondere von 4 bis 100 Einheiten. R_1 im Rest X ist besonders bevorzugt Methoxy oder Ethoxy, insbesondere Methoxy. Am meisten bevorzugt ist X Methoxypolyethylenglykol mit 1 bis 1000 , insbesondere 4 bis 50 Ethyleneinheiten. Kurzkettige Methoxypolyethylenglykol-Reste, beispielsweise mit 3 bis 10 , insbesondere mit 3 bis 4 Ethyleneinheiten werden besonders bevorzugt monodispers eingesetzt. In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform enthält der Rest X eine Targeting-Gruppierung, wie oben angegeben. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Abschirmfunktion durch die Formel (II) und die Targeting-Funktion in einem Rest X vorhanden. Ein solcher Rest X weist bevorzugt die Formel (IIb)

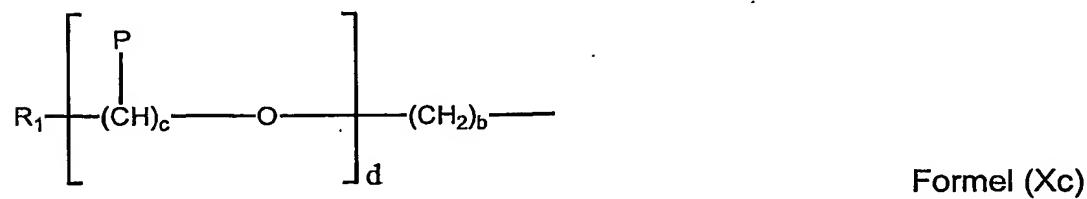


auf, worin die Bedeutungen der Platzhalter hierin wie oben angegeben sind.

Der Rest Z, welcher bei Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen
 5 mittels Ugi-Reaktion aus dem Isonitril (Z-NC) stammt, ist bevorzugt ein C₁-C₈-Alkylrest oder ein Rest, welcher eine, zwei oder mehr Gruppierungen der Formel (II) enthält sowie gegebenenfalls eine Targeting-Funktion. Besonders bevorzugt ist Z eine Gruppierung der Formel (Xa), (Xb) oder (Xc)



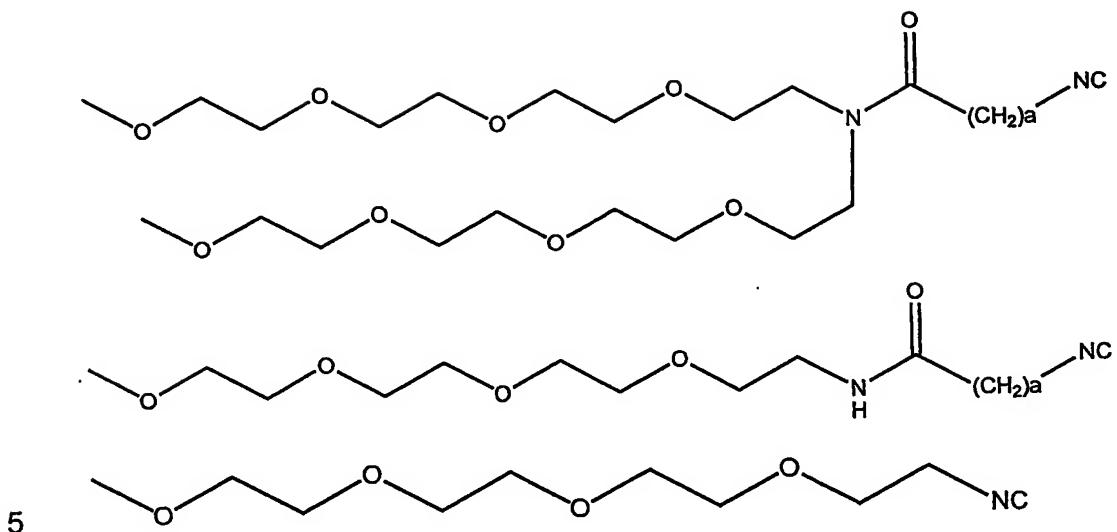
15



und insbesondere

20

- 14 -



worin

P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, C₁-C₄-Alkyl, O-R₂ oder CO-R₃ darstellt (wobei R₂ und R₃ wie oben definiert sind),

10 R₁ H, OH oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist, welcher Heteroatome enthalten kann und bevorzugt ein C₁-C₁₀-Alkoxyrest ist, a bei jedem Auftreten eine ganze Zahl von 0 bis 50, insbesondere von 1 bis 3 darstellt,

15 b bei jedem Auftreten eine ganze Zahl von 0 bis 50, insbesondere von 1 bis 3 darstellt,

c bei jedem Auftreten eine ganze Zahl von 1 bis 10, insbesondere 2 bis 4 ist und

d bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1.000, insbesondere von 5 bis 100 ist.

20 Die Reste W, welche bei Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen durch eine Ugi-Reaktion aus der Carbonylverbindung stammen, sind bei jedem Auftreten unabhängig bevorzugt Wasserstoff oder ein C₁-C₆-Kohlenwasserstoffrest, insbesondere ein C₁-C₄-Alkylrest und am meisten bevorzugt Wasserstoff, Methyl oder Ethyl. In einer besonders bevorzugte Ausführungsform sind die beiden Reste W in Verbindungen der Formel (I) identisch, stammen also von Formaldehyd (W = W = H) oder von symmetrischen Ketonen, wie beispielsweise Aceton oder 3-Pantanone. Durch die Verwendung von symmetrischen Ketonen wird das Entstehen eines Symmetriezentrums an dem Kohlenstoffatom, an das die Reste W gebunden

30

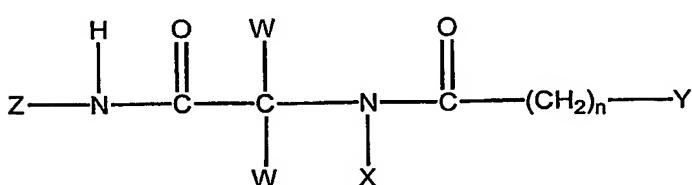
sind, verhindert. Dadurch treten keine mit chiralen Verbindungen assoziierten Probleme bei Bildung von Konjugaten mit Wirkstoffen auf. Besonders bevorzugt ist W bei jedem Auftreten Wasserstoff.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird der Rest W durch Verwendung eines Aldehyds als Ausgangsstoff bei der Ugi-Reaktion eingeführt. In diesem Fall ist einer der Reste W Wasserstoff, während der andere Rest W bevorzugt ein C₁-C₆-Kohlenwasserstoff und insbesondere ein C₁-C₄-Alkylrest ist. In diesem Fall kann einer der Reste W eine Gruppe der 10 Formel (II), einen Linker oder/und eine Targeting-Gruppe enthalten.

Der Rest V schließlich stammt aus der Carbonsäureverbindung bei Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen mittels Ugi-Reaktion. Bevorzugt enthält die Gruppierung V einen Linker bzw. eine Bindegruppe Y 15 zur Kopplung der erfindungsgemäßen Verbindungen an weitere Moleküle, insbesondere an biotechnologische, pharmazeutische oder synthetische Wirkstoffe. Der Rest V kann neben der Bindegruppe eine Linkergruppe enthalten, bevorzugt eine C₁-C₈-Alkylengruppe oder eine Glykolgruppe, beispielsweise eine Tetraethylenglykolgruppe.

20 In der oben beschriebenen bevorzugten Ausführungsform weisen die Verbindungen der Formel (I) bevorzugt eine bis drei, mehr bevorzugt zwei bis drei Gruppen der Formel (II) auf, nämlich eine Gruppe im Rest X und eine oder zwei Gruppen im Rest Z.

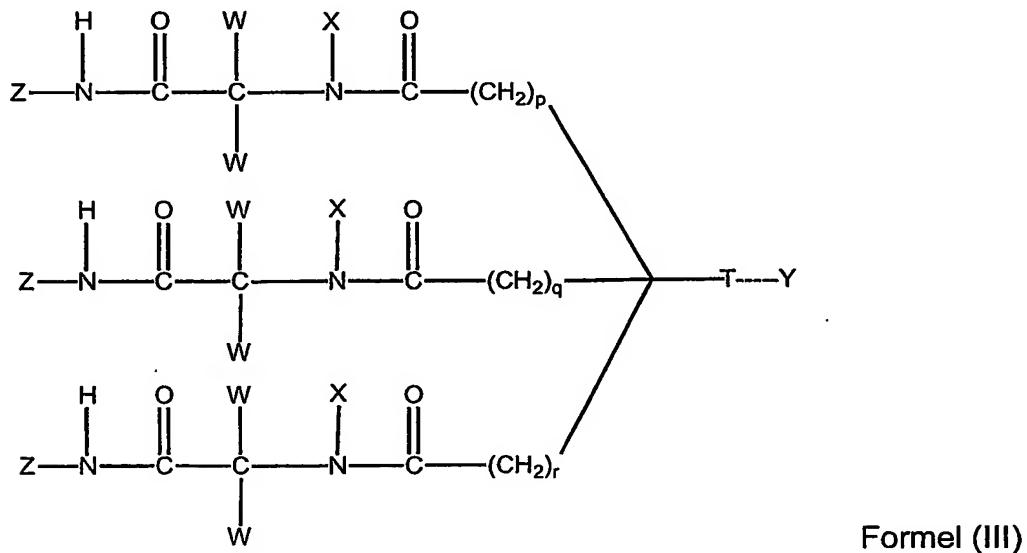
25 Eine besonders bevorzugte Struktur solcher Verbindungen ist im Folgenden als Formel (XI) dargestellt, wobei n = 0 bis 10.



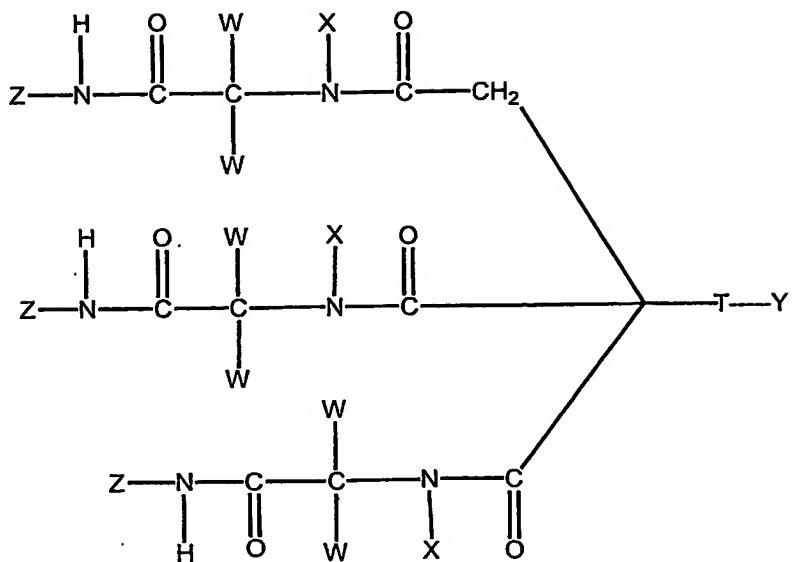
Formel (XI)

30 Während oben eine bevorzugte Ausführungsform der Erfindung, nämlich die Herstellung von Verbindungen unter Verwendung von monofunktionellen Ausgangsmaterialien mittels Ugi-Reaktion näher erläutert wurde, können in

einer weiteren erfindungsgemäßen bevorzugten Ausführungsform polyfunktionelle Ausgangsmaterialien eingesetzt werden. Dazu wird wenigstens eines der Ausgangsmaterialien der Ugi-Reaktion in polyfunktioneller Form, also in difunktioneller, trifunktioneller oder höherfunktioneller Form eingesetzt. Besonders bevorzugt wird wenigstens ein bifunktionelles Ausgangsmaterial, also eine Dicarbonsäure, ein Diamin, ein Diisonitril oder/und ein Dialdehyd bzw. Diketon und bevorzugt mindestens eine Dicarbonsäure oder/und ein Diamin eingesetzt. Durch Verwendung solcher polyfunktioneller Ausgangsmaterialien werden Verbindungen der Formel (I) erhalten, in welchen mehrere Gruppen V, X, W und Z und insbesondere mehrere Gruppierungen X und Z vorliegen und somit eine Vielzahl an Gruppierungen der Formel (II) vorgesehen sein können. Ein Beispiel für solche Verbindungen, in denen eine Tricarbonsäure als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, wird durch die folgende allgemeine Formel (III) repräsentiert:



und insbesondere



wobei

p, q, r unabhängig voneinander eine ganze Zahl zwischen 0 und 50, mehr bevorzugt zwischen 0 und 10 sein kann. Bevorzugt ist r = 0.

5 Verbindungen der Formel (III) können mit einem Verfahren auf der Basis einer Ugi-4-Komponentenreaktion hergestellt werden, an der eine Carbonyl-, Amino-, Isonitril- und Säurekomponente beteiligt sind. Diese Komponenten können gegebenenfalls gleichzeitig miteinander umgesetzt werden und Schutzgruppen enthalten, die später entfernt werden oder im Molekül
10 verbleiben.

Die Säurekomponente in Formel (IIIa) ist hier eine 1,1,2-Ethantricarbonsäure, die zusätzlich eine Linkergruppe an der 1-Position trägt. Die zur Herstellung von Verbindungen der Formel (IIIa) verwendete
15 Carbonylkomponente ist bevorzugt Formaldehyd oder eine symmetrische Carbonylverbindung, z.B. Aceton oder Cyclohexanon. Hierdurch wird die Entstehung von Diastereoisomerengemischen vermieden. Alternativ können auch unsymmetrische Aldehyde, z.B. Isobutyraldehyd, oder Ketone verwendet werden.

20 Der Linker T ist bevorzugt repräsentiert durch eine Alkylkette, die verzweigt oder unverzweigt, gesättigt oder ungesättigt ist, und Heteroatome, insbesondere N, S und O, z.B. zwischen der Verzweigung und T enthalten kann. Bevorzugt weist T ein Kohlenstoffatom oder ein Stickstoffatom als

- 18 -

Verknüpfung zur Verzweigungsstelle in den Verbindungen der Formel (III) bzw. (IIIa) auf. Mehr bevorzugt ist T eine Alkylkette der Struktur 1.

$$T = -(CH_2)_m-$$

5

Struktur 1

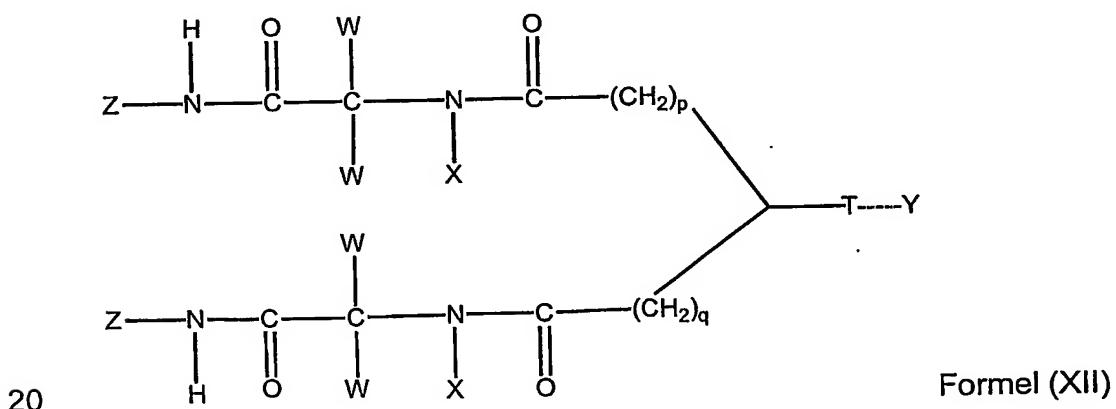
wobei m eine ganze Zahl von 1 bis 10, bevorzugt aber eine ganze Zahl von 1 bis 5 ist.

10 Für den Fall,

dass Y ein Acetal darstellt, weist der Linker die Struktur T' auf:

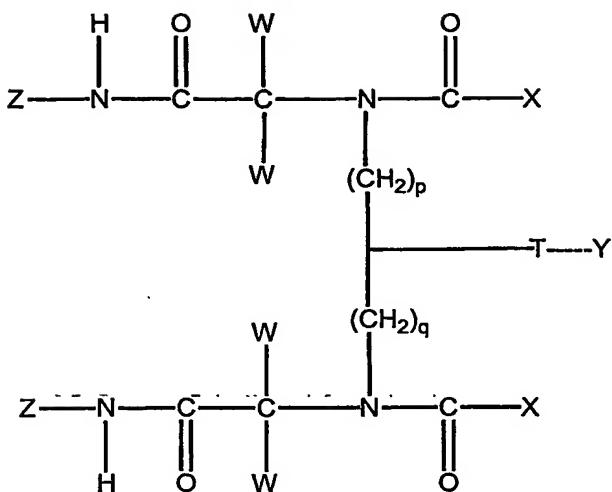
15

Weitere bevorzugte Verbindungen, in denen eine Dicarbonsäure als Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, werden durch die allgemeine Formel (XII) repräsentiert:



worin p und q jeweils ganze Zahlen von 0 bis 5 darstellen. Bevorzugte Verbindungen, die durch Verwendung von Diaminen erhältlich sind, werden durch die allgemeine Formel (XIII) dargestellt:

25



Formel (XIII)

worin p und q jeweils ganze Zahlen von 0 bis 5 darstellen.

5 Die vorliegende Erfindung trägt dazu bei, die beschriebenen, im Stand der Technik auftretenden Nachteile oder Einschränkungen zu verringern. Sie umfasst die Synthese bifunktionaler Verbindungen, welche zur Modifikation von Naturstoffen, technischen Produkten, biotechnologischen und synthetischen Produkten oder von pharmazeutischen Wirkstoffen verwendet
 10 werden können.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen enthalten eine aktivierte Linkergruppe, die mit einer oder mehreren Aminofunktionalitäten oder anderen funktionellen Gruppen eines biotechnologischen oder synthetischen
 15 Produktes im Rahmen einer chemischen Reaktion unter milden Reaktionsbedingungen eine kovalente Bindung eingeht und mindestens eine Polymerfunktion, die die biochemischen und pharmakologischen Eigenschaften des Konjugats beeinflussen. In bevorzugten Ausführungen enthalten die Verbindungen weitere Funktionen, wie z.B. Targeting-Funktionen.
 20

Die vorliegende Erfindung stellt bevorzugt eine mehrfach verzweigte Struktur bereit, sowie deren Synthese und Anwendung zur Modifikation von biotechnologischen Produkten. Die Struktur kann unter Verwendung einer
 25 Mehrkomponentenreaktion, z.B. der Ugi-Reaktion (Ugi, I. et al., Angew. Chem. Int. Ed. 2000, 39, 3168-3210; EP 1104677), hergestellt werden. Die Verwendung der Mehrkomponentenreaktion ermöglicht einen

- 20 -

kombinatorischen Ansatz sowie die Automation der Herstellung.

Die vorliegende Erfindung stellt bevorzugt eine unverzweigte oder verzweigte Polymerverbindung bereit die nur eine einzige aktivierte

5 Linkergruppe trägt, wodurch Quervernetzungsreaktionen vermieden werden.

Diese Polymerverbindung ist hydrophil und biologisch verträglich. Sie ist einfach herzustellen und eröffnet breite Anwendungsmöglichkeiten bei der Modifikation pharmazeutischer Wirkstoffe und technisch eingesetzter Produkte. Konjugate der erfindungsgemäßen Polymerverbindung mit 10 pharmazeutischen Wirkstoffen ermöglichen eine Verbesserung des therapeutischen Einsatzes. Weiterhin ermöglichen diese Konjugate bei Verlängerung der Wirkdauer die Verringerung der zu verabreichenden Menge an Wirkstoff, so zum Beispiel für die Behandlung von Krebs- und Infektionskrankheiten.

15

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Herstellung der erfindungsgemäßen Verbindungen, wobei man in einer Mehrkomponentenreaktion die Einzelkomponenten der Formeln

20

X'-NH₂

(IV)

(W')₂C = O

(V)

25

Z'-NC

(VI)

und

30

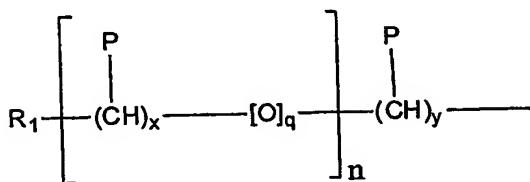
V'-COOH

(VII)

35

miteinander umsetzt, wobei V', W', X' und Z' jeweils unabhängig von einander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gegebenenfalls Heteroatome enthalten kann oder/und V', W' oder/und X' Wasserstoff darstellen, wobei wenigstens einer der Reste V', W', X' und Z' eine Bindegruppe Y trägt und wobei die Reste V', W', X' und Z'

zusammen mindestens eine, insbesondere mindestens zwei Gruppen der Formel (II)



Formel (II)

5

aufweisen, worin

P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, O-R₂ oder CO-R₃ darstellt,

R₁ H oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist, welcher Heteroatome, insbesondere O, N, S, P oder/und Si, enthalten kann,

R₂ bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 C-Atomen darstellt,

R₃ OH oder NR₄R₅ ist,

R₄ und R₅ jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest, welcher Heteroatome, insbesondere O, N, S oder/und P, enthalten kann, darstellen, wobei R₄ und R₅ zusammen auch ein Ringsystem bilden können,

n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und

x bei jedem Auftreten eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und

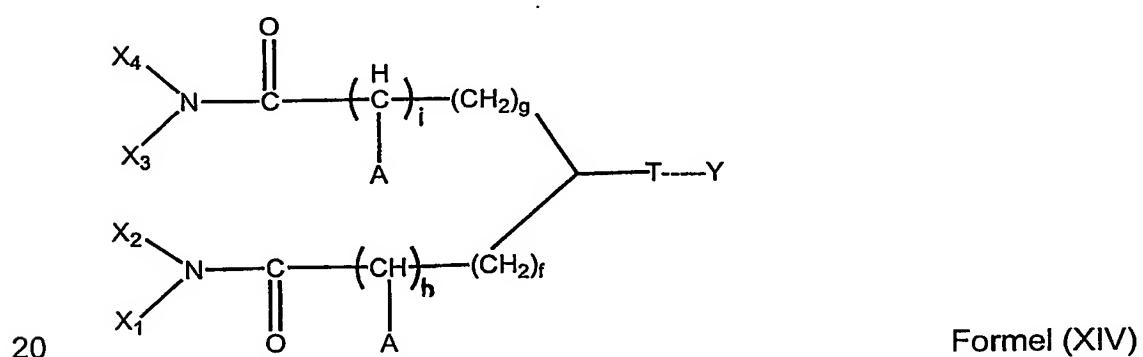
y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und

q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

25 Als Mehrkomponentenreaktion wird insbesondere eine Vierkomponentenreaktion, mehr bevorzugt eine Ugi- oder Passerini-Reaktion und am meisten bevorzugt eine Ugi-Reaktion eingesetzt. Für den Fall, dass die Reste X', W', Z' und V' keine weitere für die Mehrkomponentenreaktion reaktive Funktionalität (also NH₂, CO, NC oder COOH) mehr aufweisen, entsprechen die in den Edukten vorhandenen Reste V', W', X' und Z' gerade den in den erfindungsgemäßen Verbindungen wieder zu findenden Resten V, W, X und Z. Bevorzugt ist es aber, wenigstens ein Edukt einzusetzen, welches eine weitere Funktionalität (NH₂, CO, NC oder COOH) enthält. In

diesem Fall wird ein verzweigtes Molekül erhalten. Beispiele für solche Edukte sind die 1,1,2-Ethantricarbonsäure mit drei Carbonsäureresten, also zwei Carbonsäuregruppierungen im Rest V', oder Reste, welche mindestens zwei verschiedene funktionelle Gruppen enthalten, wie beispielsweise Lysin (enthält gleichzeitig eine Säuregruppierung und eine Aminogruppierung) oder γ-Aminobuttersäure. Bei Verwendung solcher mehrfunktioneller Edukte werden die entsprechenden Gruppierungen V, W, X bzw. Z im Produkt ausgehend von der funktionellen Gruppe im Rest V', W', X' bzw. Z' erst bei der Mehrkomponentenreaktion aufgebaut. Auf diese Weise ist es möglich, in einer Eintopfreaktion hochverzweigte und hochfunktionelle Verbindungen aufzubauen, insbesondere Verbindungen, die eine Vielzahl an Gruppierungen der Formel (II) enthalten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Verbindungen bereitgestellt, welche wenigstens zwei Gruppierungen der Formel (II) aufweisen. Diese Verbindungen weisen die allgemeine Formel (XIV) auf



worin

h, i bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 sind,

g und f bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl zwischen 0 und 10,

bevorzugt zwischen 0 und 5 sind,

A bei jedem Auftreten für H oder -(CO)-NX₂ steht und

X₁, X₂, X₃ und X₄ sowie X jeweils unabhängig voneinander die oben für X angegebenen Bedeutungen aufweisen.

Bevorzugt steht T-Y für die Gruppierung -CH₂-CH₂-CH=CH₂, wobei an der

Doppelbindung beliebige Funktionalitäten zur Kopplung an Wirkstoffe eingefügt werden können.

Weiterhin bevorzugt sind Verbindungen, in denen $g = f$, $h = i$, $X_1 = X_3$, $X_2 = X_4$, wobei in solchen Verbindungen das Kohlenstoffatom in der markierten Position 1 kein Chiralitätszentrum ist. Durch die Verknüpfung einer Dicarbonsäure oder Tricarbonsäure mit einem eine Gruppe der Formel (II) enthaltenden Amin können erfindungsgemäß achirale Moleküle hergestellt werden, die bis zu 6 (im Fall von Dicarbonsäuren) bzw. bis zu 9 (im Fall von Tricarbonsäuren) Gruppen der Formel (II) aufweisen. Da erfindungsgemäß die Kopplung von Aminen an Di- bzw. Tricarbonsäuren erfolgt; welche keine Aminosäuren sind, kann die Kopplung auf einfache Weise durchgeführt werden, ohne dass ein aufwändiges Syntheseverfahren unter Verwendung von Schutzgruppen notwendig wäre.

15 Im Rahmen der vorliegenden Erfindung werden auch Konjugate der bifunktionalen, verzweigten Polymerverbindung mit biologisch aktiven Substanzen, wie Proteinen (z.B. humane Wachstumsfaktoren), Enzymen, Co-Faktoren für Enzyme (z.B. NAD+/NADH), Liposomen, Antikörpern, synthetischen, kleinen Wirkstoffen, Phospholipiden, Lipiden, Nucleosiden, Oligonucleotiden, Mikroorganismen, humanen Zellen und Oberflächen bereitgestellt.

20 Die Erfindung betrifft deshalb auch Konjugate, umfassend Verbindungen der Formel (I) in kovalenter Verknüpfung an weitere Moleküle, insbesondere an Wirkstoffe, wie etwa Biopharmazeutika oder synthetische Wirkstoffe, oder biotechnologische Substanzen, die im Bereich „Life Science“ eingesetzt werden, z.B. im Bereich Proteomics oder Diagnostik. Solche Substanzen sind z.B. Enzyme, insbesondere Proteasen, wie z.B. Trypsin oder Chymotrypsin. Die in den Konjugaten an den erfindungsgemäßen Verbindungen verknüpften Verbindungen sind vorzugsweise Biopharmazeutika, peptidische Wirkstoffe oder andere biologisch aktive Substanzen. Weiterhin können auch Konjugate mit Oberflächen oder Biokatalysatoren gebildet werden.

25 30 35 Die Erfindung betrifft weiterhin Konjugate, umfassend Verbindungen der Formel (I) in kovalenter Verknüpfung an Medizinprodukte oder Hilfsmittel zur

Darreichung von Wirkstoffen. Durch die Anknüpfung der erfindungsgemäßen Verbindungen können beispielsweise Gewebe für Heterotransplantate, wie beispielsweise Herzklappen, für den Empfänger verträglicher gemacht werden. Weiterhin können Hilfsmittel zur Darreichung von Wirkstoffen,
5 beispielsweise Liposomen oder Nanokapseln, modifiziert werden, um ihnen gewünschte Eigenschaften, insbesondere eine längere Halbwertszeit im Körper, zu verleihen.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine pharmazeutische Zusammensetzung,
10 umfassend die erfindungsgemäßen Verbindungen und insbesondere die erfindungsgemäßen Konjugate. Solche pharmazeutischen Zusammensetzungen können beispielsweise zur Prävention oder Behandlung von Krebs, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Stoffwechsel-Erkrankungen, neuronalen bzw. cerebralen Erkrankungen oder
15 entzündlichen Prozessen, wie Infektionen, Immunerkrankungen oder Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) eingesetzt werden.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen bzw. Konjugate eignen sich auch hervorragend als diagnostische Mittel.
20

Aufgrund der Mehrkomponentenreaktion ist es erfindungsgemäß ohne weiteres möglich, eine große Vielfalt von Verbindungen nach Anspruch 1 herzustellen. Durch Variation der Edukte können über weite Bereiche variierende und den jeweiligen Erfordernissen angepasste Verbindungen erhalten werden. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind somit kombinatorische Bibliotheken bzw. die Herstellung solcher Bibliotheken, welche wenigstens zwei, mehr bevorzugt wenigstens fünf, noch mehr bevorzugt wenigstens 10 und am meisten bevorzugt wenigstens 100 der erfindungsgemäßen Substanzen enthalten. Mit Hilfe solcher Bibliotheken kann auf einfache Weise nach gewünschten Eigenschaften, beispielsweise Bindeeigenschaften an Wirkstoffmoleküle oder Abschirmegenschaften für bestimmte Wirkstoffe oder nach gewünschten Targeting-eigenschaften gescreent werden.
25
30

35 Schließlich ist es erfindungsgemäß ohne weiteres möglich, einen Kit zur Verfügung zu stellen, der alle Reagenzien und Anleitungen sowie die erfindungsgemäßen Verbindungen umfasst, die es ermöglichen, eine

Modifizierung von Proteinen, Nukleinsäuren oder anderen Wirkstoffen bzw. auch Oberflächen mit Polymeren *in vitro* auf einfache Weise durchzuführen. Die Umsetzung einer Substanz mit den erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt z.B. derart, dass zu einer Lösung oder einer Suspension der zu modifizierenden Substanz, z.B. eines Proteins, in wässrigem Puffer die erfindungsgemäße Polymer Verbindung mindestens in molarer Menge bezogen auf die Anzahl der modifizierbaren reaktiven Gruppen, z.B. Aminogruppen (Lysinreste, Histidin, N-Terminus), Carboxylgruppen (Asparaginsäure, Glutaminsäure, C-Terminus), Thiolgruppen (Cystein), Hydroxylgruppen (Serin, Threonin, Tyrosin) oder Carbonylgruppen (Aldehyde) gegeben wird. Bevorzugt werden die erfindungsgemäßen Polymer Verbindungen in einem molaren Überschuss von 1 bis 1000, mehr bevorzugt in einem molaren Überschuss von 1 bis 100 und besonders bevorzugt in einem molaren Überschuss von 1 bis 20 bezogen auf die modifizierbaren Gruppen eingesetzt.

Als Reaktionslösungen eignen sich wässrige Puffer wie beispielsweise 0,001 bis 1,0 molare Lösungen von Natrium- oder Kalium-dihydrogenphosphat mit Dinatrium- oder Dikalium-hydrogenphosphat oder Natrium-, Kalium- oder Ammonium-hydrogencarbonat mit Dinatrium-, Dinatrium- oder Diammoniumcarbonat oder Tris(hydroxymethyl)-aminoethan mit Salzsäure, bevorzugt geeignet sind Pufferlösungen für den pH-Bereich zwischen pH 4 und pH 10, besonders bevorzugt zwischen pH 5 und pH 9.

Dem Puffer können bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Cosolventien Methanol, Ethanol, Propanol, i-Propanol, Butanol, Essigsäureethylester, Essigsäuremethylester, Dimethylformamid, Acetonitril, Dimethylsulfoxid oder Sulfolan in Mengen von 0,1 bis 50 Vol-%, mehr bevorzugt 0,1 bis 20 Vol-% zugesetzt werden, je nach Löslichkeit der Reaktionspartner. Die Reaktionstemperatur liegt zwischen 0°C und 90°C, bevorzugt bei 4°C bis 40°C.

Des Weiteren können den Puffern Stabilisatoren oder Detergenzien zugesetzt sein, z.B. Natriumazid, Glycerin, Ethylenglykole bzw. ionische oder nicht-ionische Detergenzien..

Die durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlichen Konjugat-Rohprodukte können weiterhin durch Dialyse, chromatographische Verfahren oder Ultrafiltration (auch solche für Zentrifugen) mit wässrigen Pufferlösungen oder reinem Wasser sowie durch dem Fachmann geläufige
5 Verfahren gereinigt und dann der weiteren Anwendung zugeführt werden.

Der Strukturnachweis der Produkte (Konjugate), d.h. die analytische Anzahl der kovalent gebundenen erfindungsgemäßen Polymer-Verbindungen erfolgt durch die direkte Messung des Molekulargewichts, z.B. mittels der MALDI-
10 TOF-Massenspektrometrie, durch selektive Bestimmung einer oder mehrerer kovalent gebundener Komponenten oder durch indirekten Nachweis der nicht modifizierten Gruppen. So lässt sich beispielsweise ein über die erfindungsgemäße Verbindung eingeführtes Farbstoffmolekül in einfacher Weise über die Messung der Extinktion (UV/VIS) bestimmen. Ferner lässt
15 sich beispielsweise die Zahl nicht modifizierter Aminogruppen durch Umsetzung mit Fluorescamin fluorometrisch bestimmen.

Als direkter Nachweis der Verbesserung der Eigenschaften des Konjugats aus einer erfindungsgemäßen Polymer Verbindung kann beispielsweise die
20 Stabilität des Konjugats gegenüber Proteasen untersucht werden.

Die Erfindung wird durch die beigefügten Beispiele und Abbildungen weiter erläutert:

25 Abbildung 1: Analyse von Konjugaten aus L-Asparaginase und Substanz 16 mittels SDS-PAGE. Die Proben sind: Spuren 1) und 9) Protein Standard (Low Molecular Weight Marker, Amersham Pharmacia), Spur 2) L-Asparaginase (Kontrolle, 2µg), Spur 3) modifizierte L-Asparaginase (0,5eq. Substanz 16), Spur 4) modifizierte L-Asparaginase (1eq. Substanz 16), Spur
30 5) modifizierte L-Asparaginase (2eq. Substanz 16), Spur 6) modifizierte L-Asparaginase (5eq. Substanz 16), Spur 7) modifizierte L-Asparaginase (10eq. Substanz 16) und Spur 8) modifizierte L-Asparaginase (20eq. Substanz 16).

35 Abbildung 2: Proteasestabilität eines Konjugats aus L-Asparaginase und der Substanz 16:
Einfluss der Modifikation von L-Asparaginase mit Substanz 16 auf die

Stabilität von L-Asparaginase gegenüber Trypsin abgeleitet aus der Restaktivität. Durch Modifikation mit Substanz 16 wird die Stabilität gegenüber Trypsin deutlich erhöht.

5 Abbildung 3: Einfluss der Modifikation von L-Asparaginase mit Substanz 16 auf die Stabilität von L-Asparaginase gegenüber Chymotrypsin abgeleitet aus der Restaktivität. Durch Modifikation mit Substanz 16 wird die Stabilität gegenüber Chymotrypsin deutlich erhöht.

10 Abbildung 4: Analyse von Konjugaten aus Streptokinase und Substanz 16 mittels SDS-PAGE. Die Proben sind: Spuren 1) und 8) Protein Standard (Low Molecular Weight Marker, Amersham Pharmacia), Spur 2) Streptokinase (Kontrolle, 2 μ g), Spur 3) modifizierte Streptokinase (0,5eq. Substanz 16), Spur 4) modifizierte Streptokinase (1eq. Substanz 16), Spur 5) 15 modifizierte Streptokinase (2eq. Substanz 16), Spur 6) modifizierte Streptokinase (5eq. Substanz 16) und Spur 7) modifizierte Streptokinase (10eq. Substanz 16).

20 Abbildung 5: Analyse von Konjugaten aus Trypsin und Substanz 16 mittels SDS-PAGE. Die Proben sind: Spuren 1), 2) und 9) Protein Standard (Low Molecular Weight Marker, Amersham Pharmacia), Spur 2) Trypsin (Kontrolle, 2 μ g), Spur 3) modifiziertes Trypsin (0,5eq. Substanz 16), Spur 4) 25 modifiziertes Trypsin (1eq. Substanz 16), Spur 5) modifiziertes Trypsin (2eq. Substanz 16), Spur 6) modifiziertes Trypsin (5eq. Substanz 16) und Spur 7) modifiziertes Trypsin (10eq. Substanz 16).

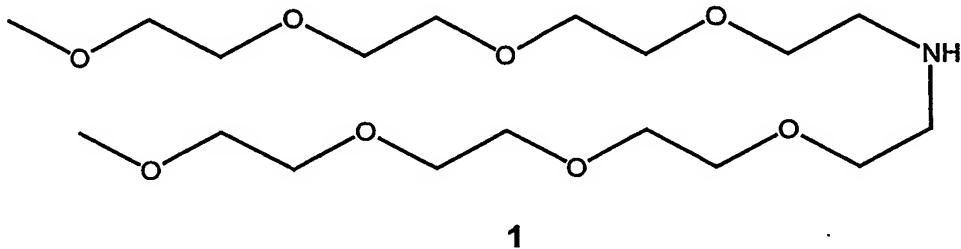
A. Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen gemäß Ansprüchen 1 bis 6

30 Im Rahmen der Mehrkomponentenreaktion werden eine Aminokomponente, eine Oxo- bzw. Carbonylkomponente, eine Isocyankomponente und eine Säurekomponente zur erfindungsgemäßen Verbindung umgesetzt.

35 Die verwendeten primären Amine sind kommerziell erhältlich oder können, ausgehend von den Monomethoxypolyethylenglykolen, durch eine Gabriel-Synthese oder aus der entsprechenden Azidoverbindung durch katalytische Hydrierung hergestellt werden. Sekundäre Amine, symmetrisch oder

unsymmetrisch, sind aus einem primären Amin durch reduktive Aminierung mit einem entsprechenden Aldehyd, der z.B. über eine Swern-Oxidation aus Monomethoxypolyethylenglykol erhalten wird, zugänglich oder können durch einfache Substitutionsreaktionen gewonnen werden.

5

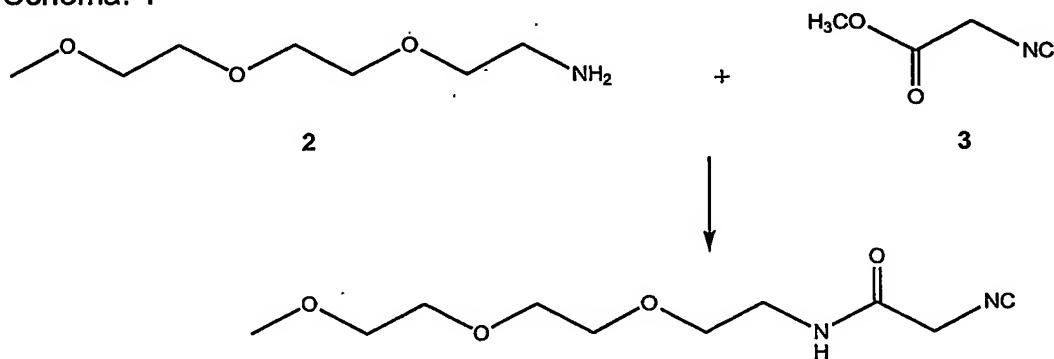


MS (ES+): m/z: 398,2 [M+H]⁺, 420,2 [M+Na]⁺; C₁₈H₃₉O₈.

Isonitrile sind im großen Umfang kommerziell erhältlich. Weiterhin steht eine

große Anzahl von synthetischen Methoden zu deren Herstellung zur
10 Verfügung. Ein sehr zuverlässiges Verfahren ist die Darstellung von
Isonitrilen aus primären Aminen über die Umsetzung zum Formamid mit
anschließender Dehydratisierung unter Verwendung von Phosgen oder
POCl₃ (I. Ugi; R. Meyr, *Angew. Chem.* 1958, 70, 702). Alternativ dazu
15 können Isonitrile auf einfache Weise durch Umsetzung eines primären oder
sekundären Amins mit einem Ω -Isocyanocarbonsäuremethyl- bzw. ethylester
erhalten werden.

Schema: 1



20

Zu 2 (3,00 g; 18,4 mmol) wird unter Rühren Isocyanoessigsäuremethylester (1,82 g; 18,4 mmol) bei 20-25°C zugegeben. Die erhaltenen Reaktionsmischung wird anschließend 24 Stunden bei 20-25°C gerührt.

- 29 -

Säulenchromatographische Reinigung ergibt 4 (3,64 g; 86 %) als hellgelbes Öl.

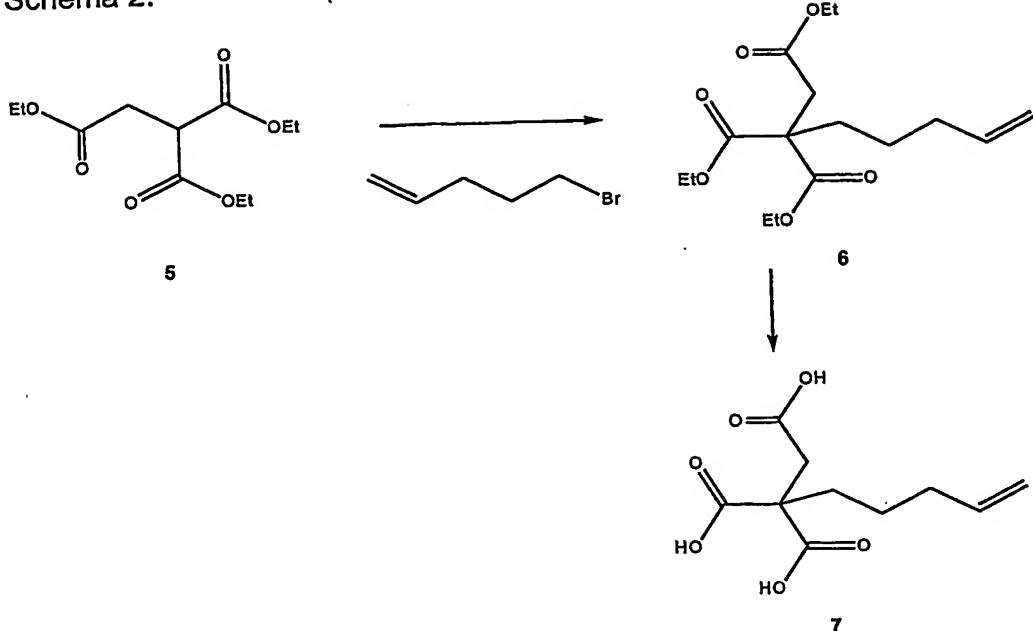
MS (ES-): m/z: 229.2 [M-H]⁻, MS (ES+): m/z: 231.1 [M+H]⁺; C₁₀H₁₈N₂O₄

5 Als Oxo- bzw. Carbonylkomponente kann eine große Anzahl an Aldehyden oder Ketonen verwendet werden. Um jedoch die Bildung von Chiralitätszentren und die sich daraus ergebenden Enatiomeren- bzw. Diastereomerengemischen (höherer Verzweigungsgrad) zu vermeiden, werden symmetrische Ketone, wie z.B. Aceton, und der einfache
10 Formaldehyd bevorzugt verwendet. Zur Darstellung von Aldehyden des Polyethylenglykols bzw. Monomethoxyethylenglykols gibt es eine breite Auswahl an synthetischen Möglichkeiten. Sie können durch direkte Oxidation der terminalen Hydroxyfunktion (z.B. Swern-Oxidation) oder auch aus ungesättigten Ethern oder Estern (z.B. Allylethern) durch oxidative Spaltung
15 der Doppelbindung (z.B. Ozonolyse, kat. OsO₄/NaIO₄) erhalten werden.

Die Säurekomponente dient gleichzeitig als Linker für die spätere Kopplung an den Wirkstoff, sodass bevorzugt Carbonsäuren verwendet werden, die durch wenige synthetische Schritte nach erfolgreicher
20 Mehrkomponentenreaktion in eine aktivierte Form der erfindungsgemäßigen Verbindung umgewandelt werden können. Dies können Monoester von Dicarbonsäuren (z.B. Bernsteinsäure-mono-tert-butylester) oder ungesättigte Monocarbonsäuren (z.B. 4-Pentencarbonsäure) sein. Zur Erreichung eines höheren Verzweigungsgrades der erfindungsgemäßigen
25 Verbindung können N-substituierte Aminosäuren (z.B. N-Boc-L-Glutaminsäure, N-Boc-L-Asparaginsäure) oder höherverzweigte Carbonsäuren (z.B. Tricarbonsäure 7) verwendet werden.

7 ist einfach aus der CH-aziden Verbindung 5 in zwei Schritten zugänglich.
30 Alternativ dazu kann diese Verbindung auch ausgehend von Malonsäure dargestellt werden (A.N. Blanchard, D.J. Burnell, *Tetrahedron Lett.* 2001, 42, 4779-4781). Solche Tricarbonsäuretriester können auch durch thermische Decarboxylierung in die Dicarbonsäurediester überführt werden, sodass sehr leicht eine Vielzahl von Dicarbonsäuren verfügbar wird.

Schema 2:



5 Zu einer Suspension von NaH (34 mg; 60 % in Öl) in einer Mischung von THF (3 mL) und DMF (1mL) wird **5** (200 mg; 0,81 mmol) bei 20-25°C zugegeben. Nach ca. 10 min (Wasserstoffentwicklung) wird 5-Brom-1-penten (121 mg; 0,81 mmol) bei 20-25°C zugegeben. Die erhaltene Reaktionsmischung wird anschließend bei 50°C 48 Stunden gerührt. Nach dem Abkühlen auf 20-25°C wird die Reaktionsmischung mit einer Ammoniumchloridlösung (0,5 M; 2mL) verdünnt. Chromatographische Reinigung des Rohproduktes, das durch Extraktion mit Ethylacetat erhalten wird, ergibt **6** (214 mg; 84 %) als farbloses Öl.

10 ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1,20-1,40 (1H); 1,93-2,10 (4H); 2,97 (s, 2H); 4,15-4,25 (OCH₂, 6H); 4,95-5,05 (2H); 5,70-5,85 (1H)

15 MS (ES+): m/z: 315,1 [M+H]⁺, 337,0 [M+Na]⁺; C₁₆H₂₆O₆.

Zu einer Lösung von **6** (2,0 g; 6,4 mmol) in Ethanol (20mL) wurde NaOH (2M, 5mL) bei 20-25°C gegeben. Diese Mischung wurde auf 55°C erhitzt und anschließend 72 Stunden bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktionsmischung wurde anschließend auf 20-25°C abgekühlt und das Ethanol wurde im Vakuum entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser/Methanol (1:1, 20mL) gelöst und auf aktiviertes Dowex 50 (H⁺-Form

- 31 -

10 g) aufgegeben. Das Produkt wurde mit Wasser/MeOH (4:1,40 mL) eluiert. Azeotrope Destillation mit Toluol im Vakuum ergibt 7 (1,45 g, quantitativ) als weiß-grauen Feststoff.

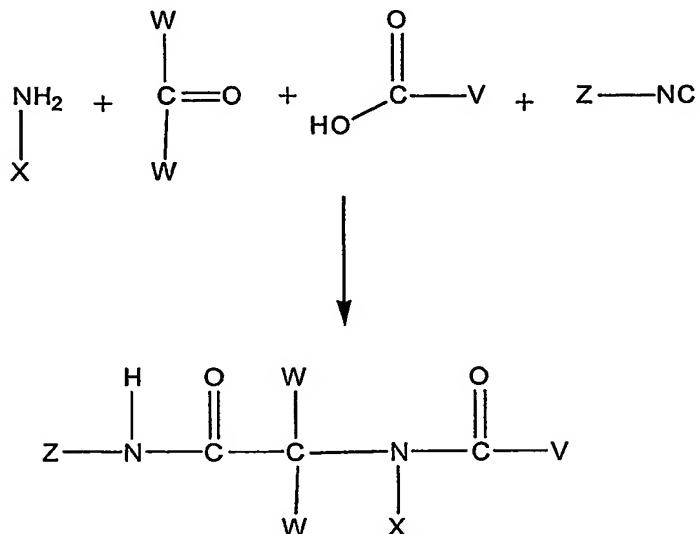
5 $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, DMSO-d6): $\delta = 1,15\text{-}1,29$ (2H); 1,75-2,05 (4H); 2,72 (s, 2H); 4,87-5,05 (2H); 5,63-5,85 (1H).

$^{13}\text{H-NMR}$ (50 MHz, DMSO-d6): $\delta = 23,39; 32,25; 33,41; 37,25; 54,43; 115,16; 138,33; 171,90; 172,31; 172,32$.

MS (ES+): m/z: 231,0 [M+H] $^+$, 253,0 [M+Na] $^+$; $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_6$.

10 Der Hauptschritt der Synthese der erfindungsgemäßen Verbindungen erfolgt durch eine Mehrkomponentenreaktion, wobei die Ugi-Reaktion mit drei (U-3CR) oder vier (U-4CR) Komponenten in flüssiger Phase bevorzugt ist. Im Fall der U-4CR wird in flüssiger Phase die Aminkomponente mit der Oxokomponente, der Säurekomponente und einer Isocyanokomponente 15 nach der folgenden allgemeinen Formel zur Reaktion gebracht:

Schema 3: Allgemeines Reaktionsschema U-4CR



20 Vorteilhaft ist es, je ein Äquivalent der Einzelkomponenten bei der Umsetzung zu verwenden. Weiterhin kann es auch von Vorteil sein, das Azomethin durch eine Vorkondensation zu bilden. Als Lösungsmittel können aprotische, polar sowie unpolar, und protische, polare verwendet werden.

25 Besonders eignen sich hierfür als protische Lösungsmittel Alkohole, wie Methanol, Ethanol, Wasser bzw. Wasser/Alkoholgemische sowie DMF oder

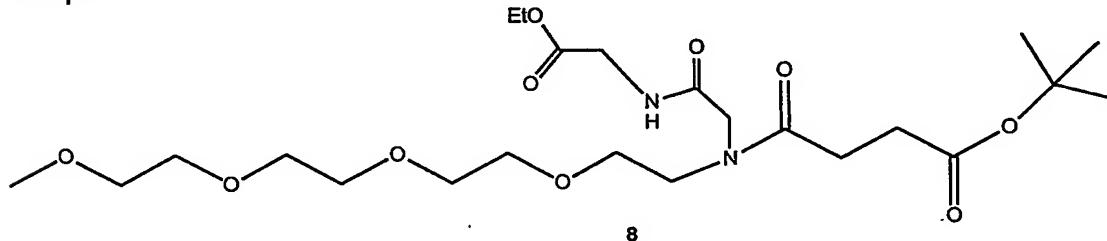
Acetonitril. Bei den aprotischen Lösungsmitteln werden häufig Dichlormethan, Tetrahydrofuran oder Chloroform verwendet. Lewis Säuren, wie Bor trifluoridetherat oder Zinkchlorid, wirken förderlich auf die Ugi-Reaktion. Üblicherweise werden die Reaktionen bei -20°C bis 100°C durchgeführt, jedoch sind Reaktionstemperaturen zwischen 0°C und 50°C bevorzugt.

Allgemeine Vorschrift:

Eine Lösung aus der Aminkomponente (3,4 mmol) und der Oxokomponente (3,4 mmol) in Methanol (30 mL) wird 10 - 15 min gerührt. Zu dieser Lösung wird anschließend das Isonitril (3,4 mmol) und die Säurekomponente (3,4 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 12 Stunden gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt chromatographisch oder durch Kristallisation gereinigt.

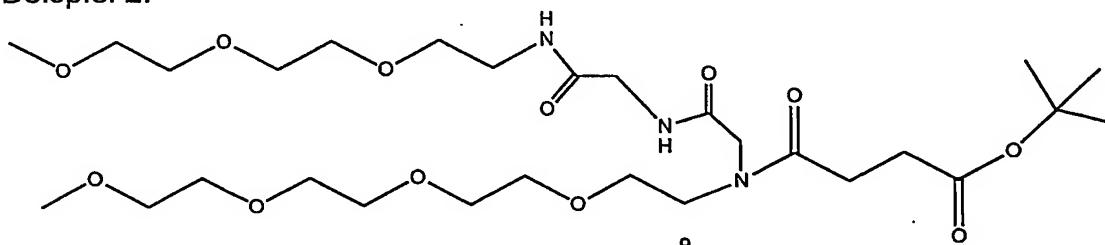
15

Beispiel 1:



¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1,21 (t, 3H); 1,37 (s, 9H); 2,45-2,65 (4H); 3,32 (s, 3H); 3,45-3,65 (16H); 3,90-3,99 (2H); 4,05-4,16 (4H); 7,18 (t, NH);
MS (ES+): m/z: 507,3 [M+H]⁺, 529,3 [M+Na]⁺; C₂₃H₄₂N₂O₁₀.

Beispiel 2:

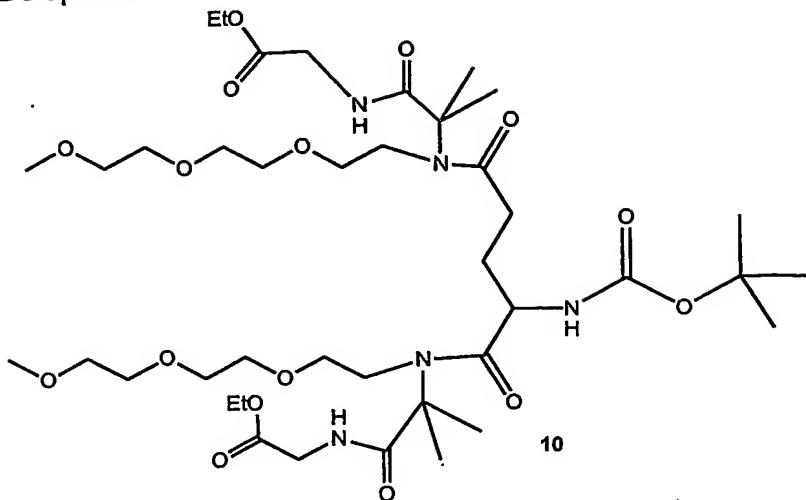


25

MS (ES+): m/z: 624,4 [M+H]⁺, 646,4 [M+Na]⁺; C₂₈H₅₃O₁₂

- 33 -

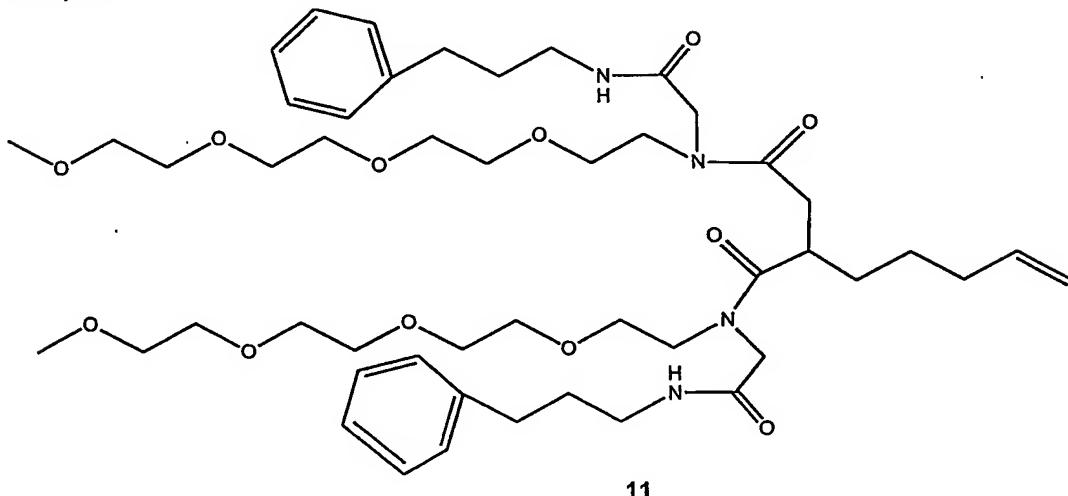
Beispiel 3:



MS (ES+): m/z: 902,9 [M+H]⁺; (ES-): m/z: 879,1 [M-H]⁻; C₄₀H₇₃N₅O₁₆

5

Beispiel 4:

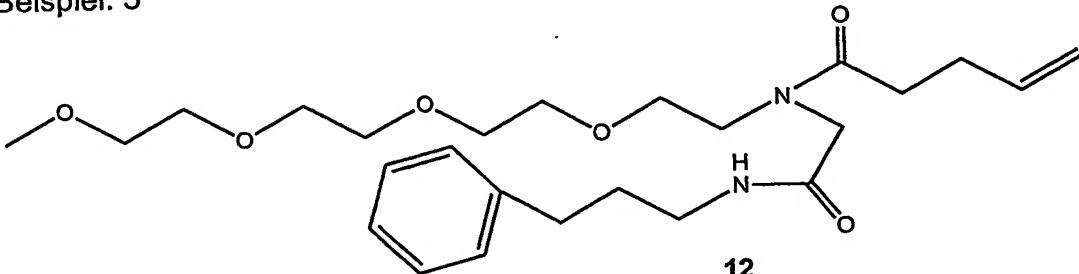


10 MS (ES+): m/z: 916,3 [M+H]⁺; 938,3 [M+Na]⁺; C₄₉H₇₈N₄O₁₂

Weiterhin kann es von Vorteil sein, Säurekomponenten zu verwenden, die gleichzeitig als Schutzgruppe der Aminofunktionalität dienen. Solche Schutzgruppen können anschließend entfernt werden, sodass das gebildete sekundäre Amin auch über allgemein bekannte Methoden aus der Peptidchemie später an Carbonsäuren gekoppelt werden kann. Beispiele für
15

solche Säuren sind Trifluoressigsäure oder 4-Pentencarbonsäure.

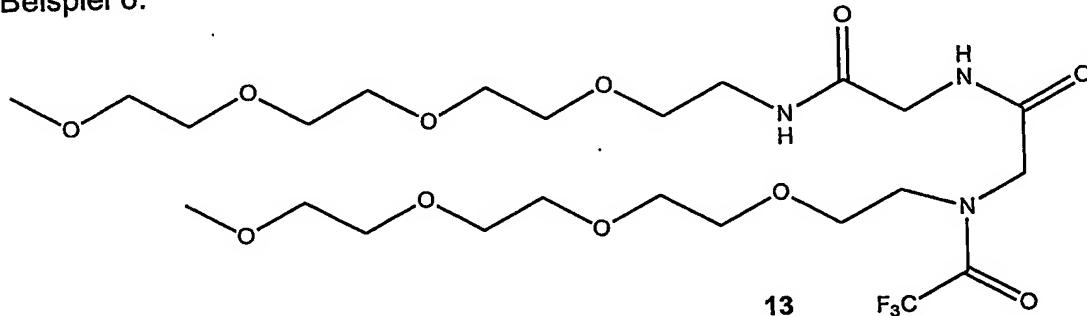
Beispiel: 5



5

MS (ES+): m/z: 465,3 [M+H]⁺; 487,3 [M+Na]⁺; C₂₅H₄₀N₂O₆

10 Beispiel 6:



MS (ES+): m/z: 608,6 [M+H]⁺; 630,3 [M+Na]⁺; C₂₄H₄₄F₃N₃O₁₁.

15 In manchen Fällen kann es von Vorteil sein, die Säurekomponente durch eine Säure zu ersetzen, die nicht im Sinne der Ugi-Reaktion reagiert. Als Säuren kommen z.B. Mineralsäuren, wie Salz- oder Schwefelsäure, Sulfonsäuren und Lewissäuren, wie Bortrifluoridetherat oder InCl₃ zum Einsatz. Wasser übernimmt bei dieser U-3CR die Funktion der Säurekomponente, wobei ein sekundäres Amin gebildet wird. Dieses sekundäre Amin kann danach durch verschiedene Amidierungsmethoden, die aus der Peptidchemie bereits bekannt sind, an verzweigte oder unverzweigte Carbonsäurefunktionalitäten gekoppelt werden. Im Fall der U-3CR wird in flüssiger Phase die Aminkomponente mit der Oxokomponente, der Säurekomponente (z.B. Schwefelsäure) und einer Isocyanokomponente

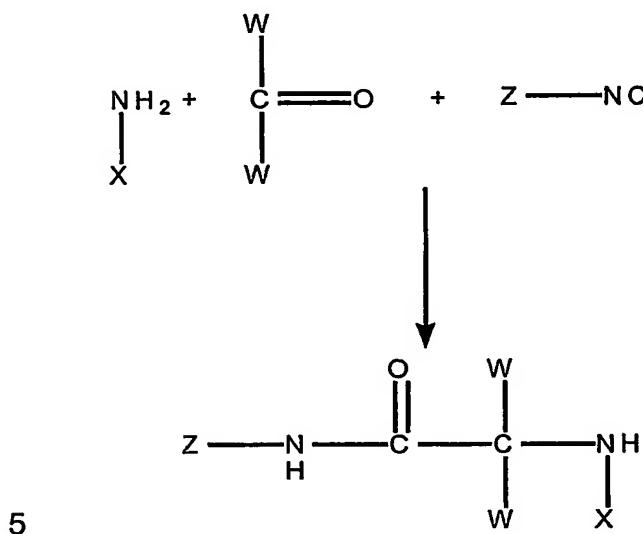
20

25

- 35 -

nach der folgenden allgemeinen Formel zur Reaktion gebracht:

Schema 3: allgemeines Reaktionsschema U-3CR



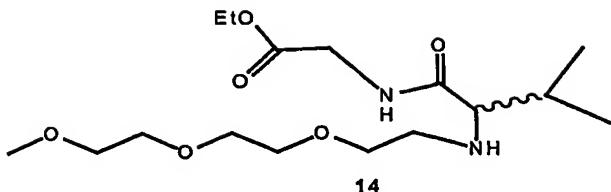
Vorteilhaft ist es, je ein Äquivalent der Einzelkomponenten bei der Umsetzung zu verwenden. Weiterhin kann es auch von Vorteil sein, das Azomethin durch eine Vorkondensation zu bilden. Als Lösungsmittel können 10 aprotische, polar sowie unpolar, und protische, polare verwendet werden. Besonders eignen sich hierfür als protische Lösungsmittel Alkohole, wie Methanol, Ethanol, Wasser bzw. Wasser/Alkoholgemische sowie DMF oder Acetonitril. Bei den aprotischen Lösungsmitteln werden häufig Dichlormethan, Tetrahydrofuran oder Chloroform verwendet. Üblicherweise 15 werden die Reaktionen bei -20°C bis 100°C durchgeführt, jedoch sind Reaktionstemperaturen zwischen 0°C und 50°C bevorzugt.

Allgemeine Vorschrift:

Eine Lösung aus der Aminkomponente (1,2 mmol) und der Oxokomponente (1,2 mmol) in Methanol (2 mL) wird 10 - 15 min gerührt. Zu dieser Lösung wird anschließend das Isonitril (1,2 mmol) und die Säure oder eine Lewis Säure (1,2 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 12 Stunden gerührt. Anschließend wird das Lösungsmittel im Vakuum entfernt und das Rohprodukt chromatographisch oder durch Kristallisation gereinigt.

- 36 -

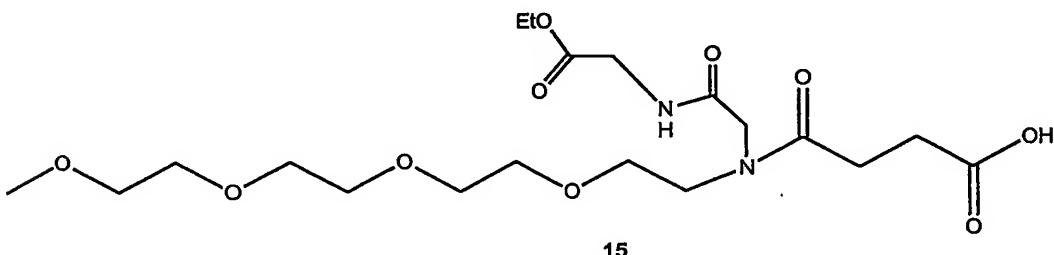
Beispiel 7:



5 MS (ES+): m/z: 349.4 [M+H]⁺, 371.4 [M+Na]⁺; C₁₈H₃₂N₂O₆

Umwandlung zu einem Aktivester am Beispiel von 7

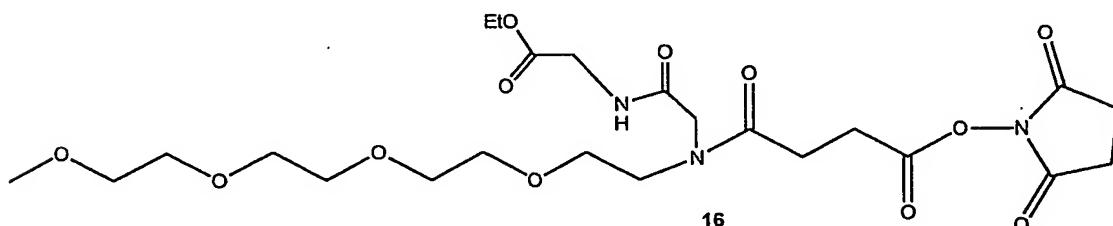
Die Spaltung des tert-Butylesters erfolgt unter Standardbedingungen z.B. mit Mineralsäuren wie HCl oder HCl in Dioxan. Alternativ dazu kann auch Trifluoressigsäure verwendet werden.



MS (ES+): m/z: 451,2 [M+H]⁺, 473,2 [M+Na]⁺; C₁₉H₃₄N₂O₁₀

15

Durch Umsetzung von **15** mit DCC und N-Hydroxysuccinimid wird **16** erhalten.



20

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃): δ = 1,23 (t, 3H); 2,64-2,70 (2H); 2,82 (bs, 4H); 2,93-3,00 (2H) 3,36 (s, 3H) 3,50-3,72 (16H); 3,96-4,05 (2H); 4,08-4,20 (4H); 7,14 (t, NH)

MS (ES+): m/z: 548,3 [M+H]⁺, 570,3 [M+Na]⁺; C₂₃H₃₇N₃O₁₂

25

B. Beispiele für die Modifikation von biopharmazeutischen, pharmazeutischen oder/und synthetischen Wirkstoffen mit erfindungsgemäßen Verbindungen

5 Die folgenden Beispiele sollen den Nutzen der erfindungsgemäßen Verbindungen demonstrieren, die Erfindung jedoch nicht einschränken.

Allgemeine Methoden: Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford mit Coomassie Brilliant Blau G-250 mit Rinderserumalbumin als Referenzprotein ermittelt (Bradford 1976, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.). Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PGAE) wurden nach Laemmli (1970) mit 7,5% Polyacrylamidgelen durchgeführt. Proteine wurden anschließend mit Coomassie Brilliant Blau R-250 angefärbt. Der Grad der Modifikation von Lysinresten wurde nach der Methode von Stocks et al. (Stocks et. al. 1986, *Anal. Biochem.* 154, 232-234) durch Quantifizierung der nicht modifizierten Aminogruppen mit Fluorescamin bestimmt ($\lambda_{\text{ex}} = 390\text{nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 475\text{nm}$).

Für die Experimente wurden Rinderserumalbumin (kurz: BSA, Sigma), L-Asparaginase (kurz: ASNase, ProThera), Streptokinase (Sigma), Trypsin (Sigma) und Chymotrypsin (Sigma) verwendet.

Bestimmung der Enzymaktivitäten: L-Asparaginase katalysiert die Deamidierung von L-Asparagin zu L-Asparaginsäure. Bei dieser Reaktion freiwerdendes Ammonium wurde zur Bestimmung der Enzymaktivität mittels Neßler Reagenz quantifiziert. Streptokinase aktiviert Plasminogen. Auf diese Weise aktiviertes Plasminogen katalysiert die Hydrolyse des Tripeptid-Derivates D-Val-Leu-Lys-para-Nitroanilid (S-2251). Zur indirekten Bestimmung der Aktivität von Streptokinase wurde die Menge an freigesetzten Nitroanilins photometrisch bei 405nm quantifiziert. Die peptidolytische Aktivität von Trypsin wurde mithilfe des para-Nitroanilid-Derivates α -Benzoyl-Arginin-para-Nitroanilid durch Quantifizierung des freigesetzten Nitroanilins photometrisch bei 405nm ermittelt.

Untersuchung der Stabilität der erfindungsgemäßen Konjugate gegenüber Proteolyse durch Trypsin bzw. Chymotrypsin: Die Konjugate, umfassend eine erfindungsgemäße Verbindung kovalent gekoppelt an einen

biopharmazeutischen, pharmazeutischen oder synthetischen Wirkstoff, wurden in Gegenwart von Trypsin oder Chymotrypsin für mindestens 90min bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und aus diesen die Restaktivität des zu untersuchenden Konjugats bestimmt. Trypsin spaltet Peptide und Proteine vorzugsweise C-terminal von basischen Aminosäuren (Lysin- und Argininresten), Chymotrypsin vorzugsweise C-terminal von aromatischen Aminosäuren (Tryptophan-, Phenylalanin- und Tyrosinresten).

10

Beispiel B1:

Herstellung eines Konjugates aus einer erfindungsgemäßen Verbindung gemäß Substanz 16 und L-Asparaginase.

Zu 75µL einer L-Asparaginase-Lösung (0,5mg/mL) in Natriumcarbonat-Puffer (pH 8,5 bis 9,5) wurde Substanz 16 (0,5eq./0,7µL, 1eq./1,4µL, 15 2eq./2,7µL, 5eq./6,8µL, 10eq./13,7µL bzw. 20eq./27,3µL) gelöst in Dimethylsulfoxid (10mg/mL) gegeben und mit Natriumcarbonat-Puffer (pH 8,5 bis 9,5) auf ein Gesamtvolumen von 150µL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1h bei 25°C und 300rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Substanz 16 mittels Filtration 20 in Zentrifugenfiltrationseinheiten (10kDa cut-off) mit Wasser als Spülflüssigkeit entfernt.

Durch die Modifizierung wird die Aktivität der L-Asparaginase nur geringfügig 25 vermindert. Bei einem PEGlyierungsgrad von 41% auf 75% Restaktivität, bei einem PEGylierungsgrad von 43% auf 60% Restaktivität. (vgl. Tabelle 1) Die Stabilität gegenüber Proteasen (Trypsin und Chymotrypsin) wird durch die PEGylierung mit Substanz 16 dagegen deutlich gesteigert. (vgl. Abbildungen 1 und 2)

30

Tabelle 1: Grad der Modifizierung und Restaktivität der Konjugate aus L-Asparaginase und Substanz 16

Eingesetzte eq. 16	MW [Da]	Grad der Modifizierung	Restaktivität
0,5	35544	3%	100%
1	35780	13%	100%
2	36651	20%	92%
5	37931	35%	87%
10	38798	41%	75%
20	39276	43%	60%

5

Beispiel B2:

Herstellung eines Konjugates aus einer erfindungsgemäßen Verbindung gemäß Substanz 16 und Streptokinase.

10 Zu 120µL einer Streptokinase-Lösung (0,25mg/mL) in Natriumcarbonat-Puffer (pH 8,5 bis 9,5) wurde Substanz 16 (0,5eq./0,9µL, 1eq./2,1µL, 2eq./3,9µL, 5eq./10,2µL bzw. 10eq./20,1µL) gelöst in Dimethylsulfoxid (5mg/mL) gegeben und mit Natriumcarbonat-Puffer (pH 8,5 bis 9,5) auf ein Gesamtvolumen von 150µL aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1h bei
15 25°C und 300rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Substanz 16 mittels Filtration in Zentrifugfiltrationseinheiten (10kDa cut-off) mit Wasser als Spülflüssigkeit entfernt.

Streptokinase wird bei 10 eingesetzten Äquivalenten der Substanz 16 zu
20 100% an den Lysin-Resten modifiziert. (vgl. Tabelle 2)

Tabelle 2: Grad der Modifizierung der Konjugate aus Streptokinase und Substanz 16

Eingesetzte eq. 16	MW [Da]	Grad der Modifizierung
0,5	48552	13%
1	52452	40%
2	55072	58%
5	60366	96%
10	62398	100%

Beispiel B3:

Herstellung eines Konjugates aus einer erfindungsgemäßen Verbindung
 5 gemäß Substanz **16** und Trypsin.

Zu 120 μ L einer Trypsin-Lösung (1,0mg/mL) in Natriumcarbonat-Puffer (pH 8,5 bis 9,5) wurde Substanz **16** (0,5eq./1,5 μ L, 1eq./2,7 μ L, 2eq./5,4 μ L, 5eq./13,8 μ L bzw. 10eq./27,3 μ L) gelöst in Dimethylsulfoxid (10mg/mL) gegeben und mit Natriumcarbonat-Puffer (pH 8,5 bis 9,5) auf ein
 10 Gesamtvolumen von 150 μ L aufgefüllt. Der Reaktionsansatz wurde 1h bei 25°C und 300rpm auf einem Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde überschüssige Substanz **16** mittels Filtration in Zentrifugfiltrationseinheiten (10kDa cut-off) mit Wasser als Spülflüssigkeit entfernt.

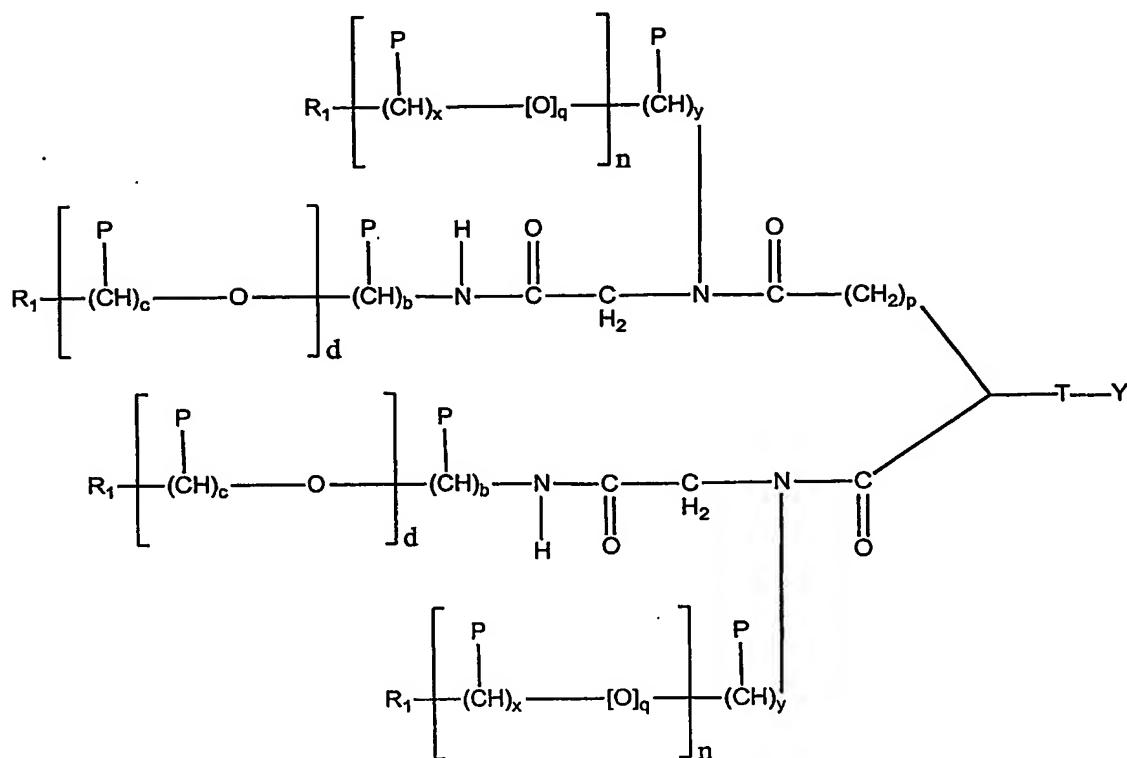
15 Trypsin wird mit 10 Äquivalenten Substanz **16** zu 44% an den Lysin-Resten modifiziert. Die Restaktivität steigt dabei auf 137%. Die Aktivitätszunahme durch Modifizierung mit Polyethylenglykolhaltigen Reagenzien wird in der Literatur durch eine Veränderung der Mikroumgebung des aktiven Zentrums erklärt (Zhang, Z., He, Z. & Guan, G. (1999) in *Biotechnology Techniques* 13: 781-786).

Tabelle 3: Grad der Modifizierung und Restaktivität der Konjugate aus Trypsin und Substanz **16**

Eingesetzte eq. 16	MW [Da]	Grad der Modifizierung	Restaktivität
0,5	28535	20%	104%
1	28891	25%	109%
2	29544	24%	119%
5	30000	41%	136%
10	30194	44%	137%

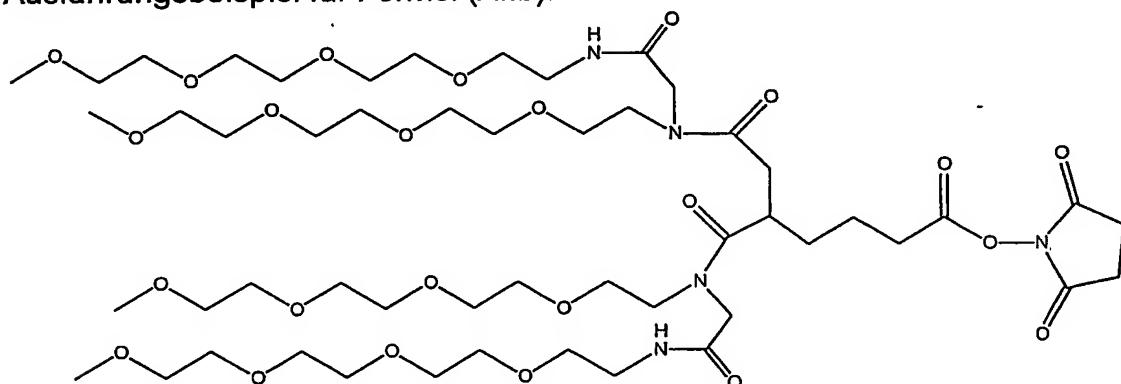
- 41 -

C. Weitere Beispiele für erfindungsgemäße Verbindungen gemäß Ansprüchen 1 bis 6

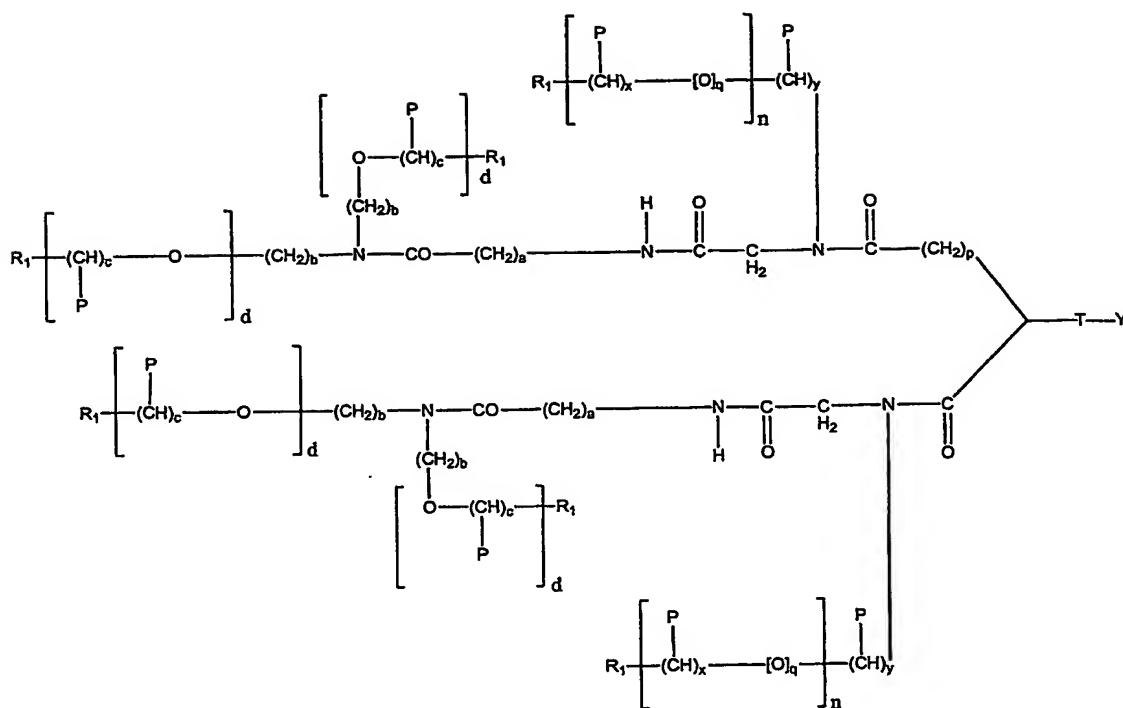


5 Formel (XIIb)

Ausführungsbeispiel für Formel (XIIb):

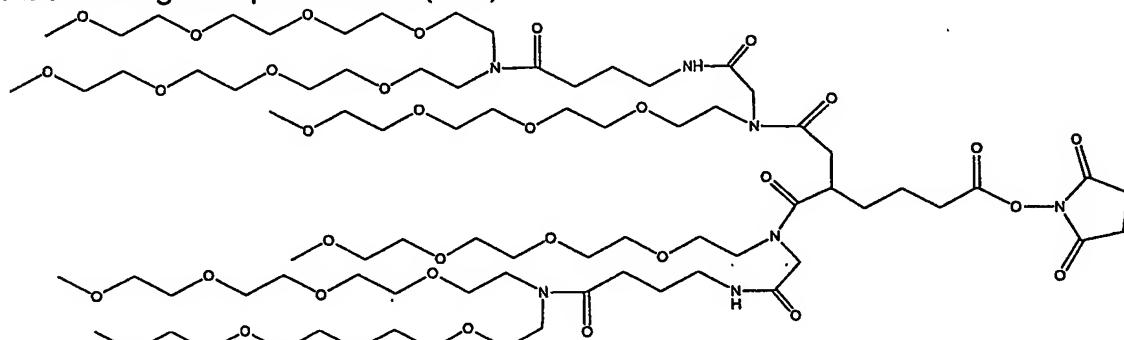


- 42 -

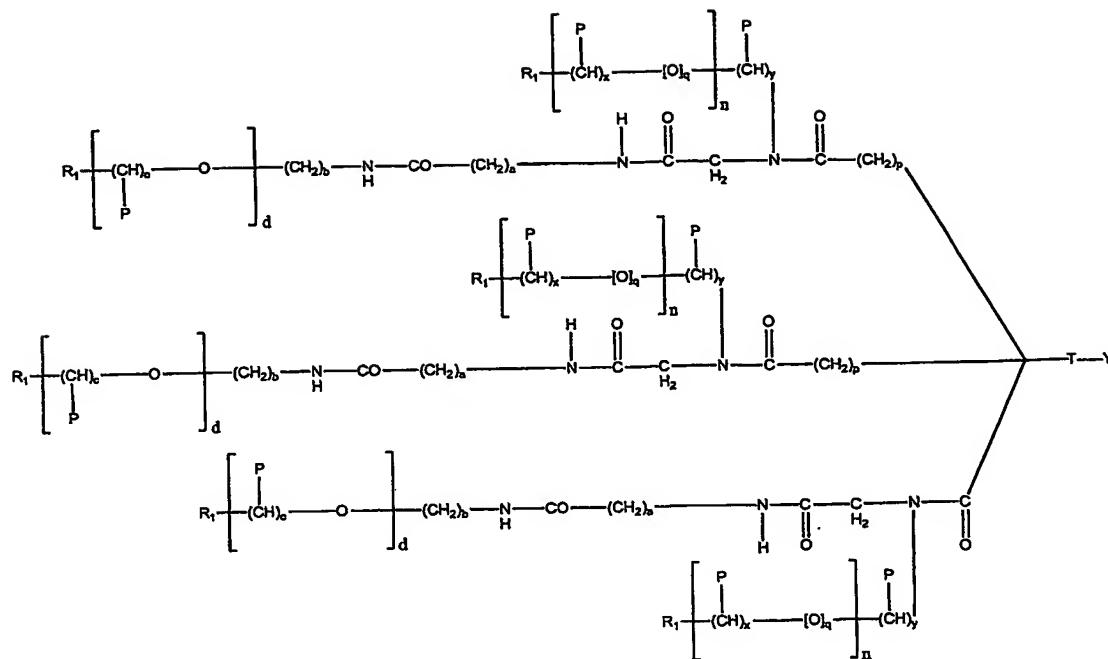


Formel (XIIc)

Ausführungsbeispiel Formel (XIIc):

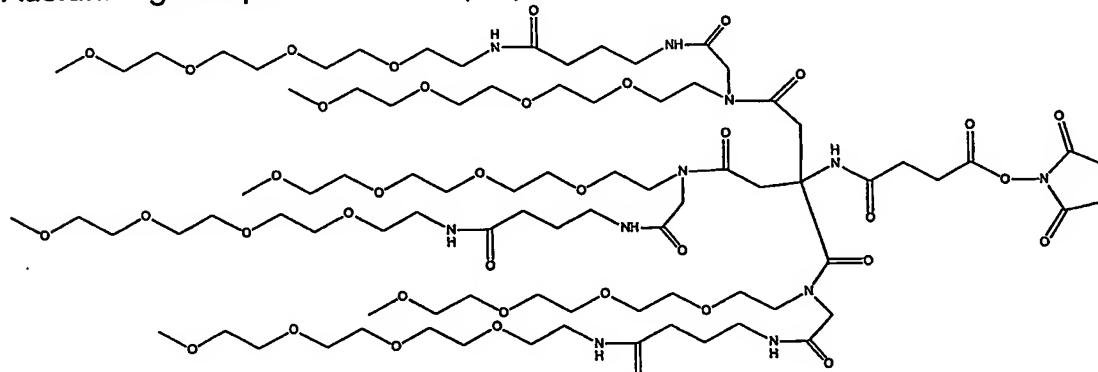


- 43 -

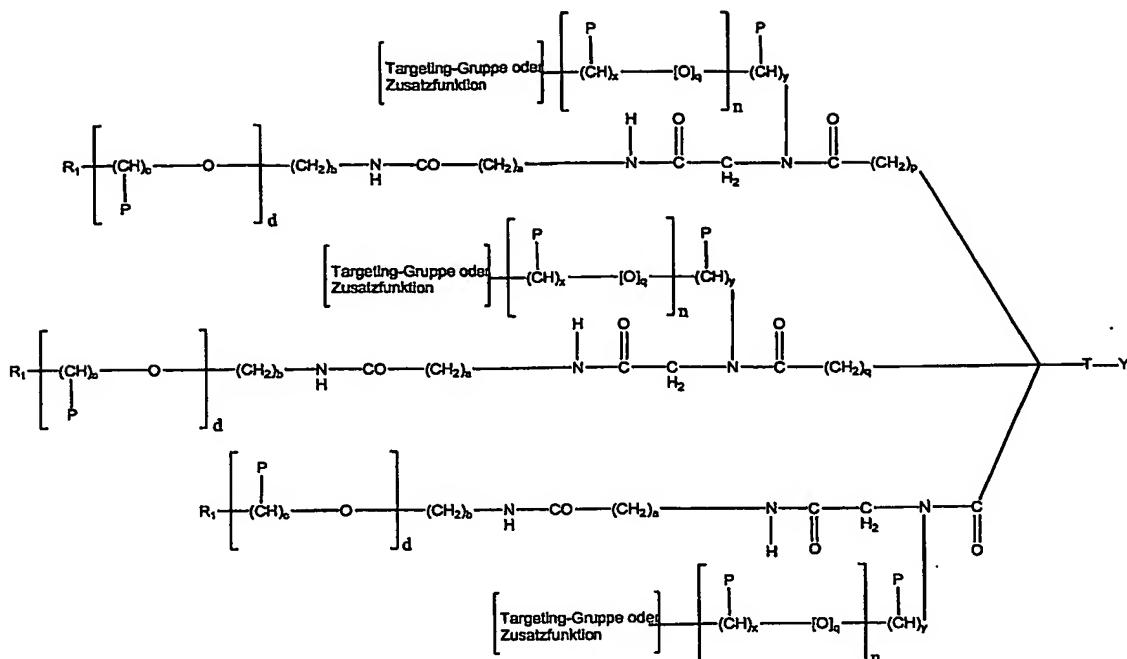


Formel (XV)

Ausführungsbeispiel für Formel (XV):

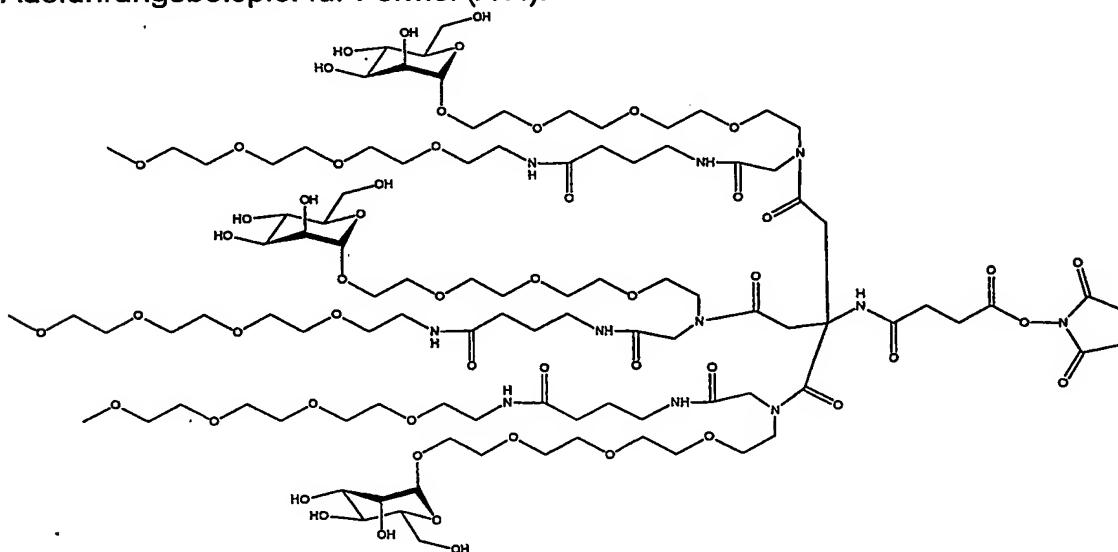


- 44 -



Formel (XVI)

Ausführungsbeispiel für Formel (XVI):



5

In den Beispielen C (Formeln XIIb, XIIc, XV und XVI) bedeuten:

P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, C₁-C₄-Alkyl, O-R₂ oder CO-R₃,10 R₁ H, OH oder einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen, welcher Heteroatome, insbesondere O oder/N, enthalten kann,R₂ bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6

C-Atomen,

R₃ OH oder NR₄R₅,

R₄ und R₅ jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest, welcher Heteroatome, insbesondere O oder/und N, enthalten kann, wobei R₄ und R₅

5 zusammen auch ein Ringsystem bilden können,

d, n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000,

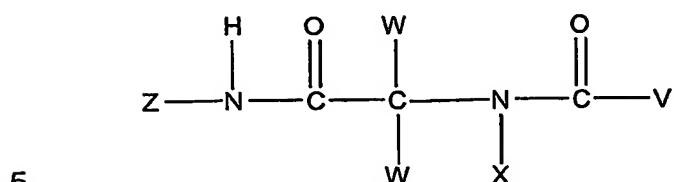
c, x bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 10 und

a, b, p, y unabhängig eine ganze Zahl von 0 bis 50 und

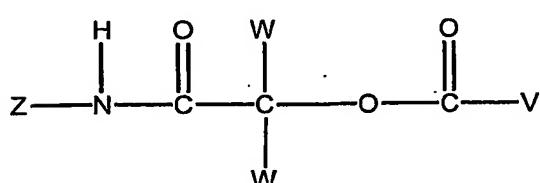
q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1.

Ansprüche

1. Verbindungen der Formel (I)



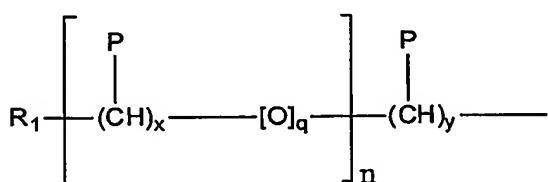
Formel (la)



Formel (lb)

worin

10 die Reste V, W, X und Z jeweils unabhängig voneinander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher Heteroatome enthalten kann oder/und V, W, oder/und X Wasserstoff darstellen, **dadurch gekennzeichnet**, dass wenigstens einer der Reste V, W, X oder/und Z eine Bindegruppe Y trägt und dass die Reste V, W, X und Z zusammen mindestens eine Gruppe der Formel (II)



Formel (II)

20 aufweisen, worin
P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, O-R₂ oder CO-R₃ darstellt,
R₁ H oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist,
welcher Heteroatome enthalten kann,
R₂ bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis
6 C-Atomen darstellt,
R₃ OH oder NR₄R₆ ist,
R₄ und R₅ jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest,

welcher Heteroatome enthalten kann, darstellen, wobei R₄ und R₅ zusammen auch ein Ringsystem bilden können,
n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und
x bei jedem Auftreten eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und
y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und
q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

5

10

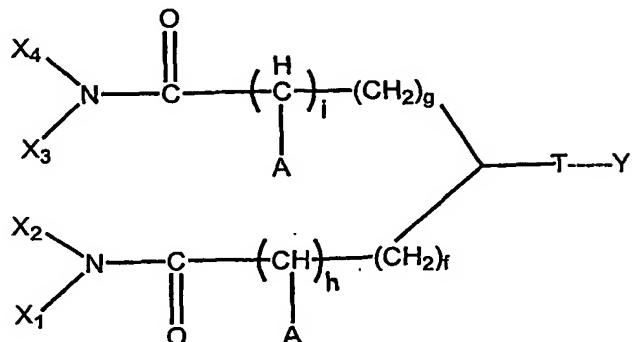
15

20

25

2. Verbindungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass die Bindegruppe Y ausgewählt ist aus Gruppen, die mit einer Aminogruppe, einer Thiolgruppe, einer Carboxylgruppe, einer Guanidin gruppe, einer Carbonylgruppe, einer Hydroxylgruppe, einem Heterozyklus, einer C-nukleophilen Gruppe, einer C-elektrophil en Gruppe, einem Phosphat oder einem Sulfat bindefähig sind oder ein Chelat oder einen Komplex mit Metallen bilden können oder eine Bindung an Silicium-haltigen Oberflächen eingehen können.
3. Verbindungen nach Anspruch 1 und 2, **dadurch gekennzeichnet**, dass sie wenigstens zwei Gruppen der Formel (II) enthält.
4. Verbindungen nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens einer der Reste X oder/und Z verzweigt ist und mindestens zwei Gruppen der Formel (II) enthält.
5. Verbindungen nach einem der vorhergehenden Ansprüche, **dadurch gekennzeichnet**, dass mindestens einer der Reste X oder/und Z weiterhin eine Targeting-Gruppierung aufweist.

6. Verbindung mit der Formel (XIV)



5

worin

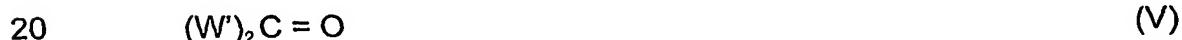
h, i bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 sind,

g und f bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl zwischen 0 und 10, bevorzugt zwischen 0 und 5 sind;

10 A bei jedem Auftreten für H oder -(CO)-NX₂ steht undX₁, X₂, X₃ und X₄ sowie X jeweils unabhängig voneinander die oben für X angegebenen Bedeutungen aufweisen.

7. Verfahren zur Herstellung einer Verbindung nach einem der

15 Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass man in einer Mehrkomponentenreaktion als Edukte die Verbindungen der Formeln



und

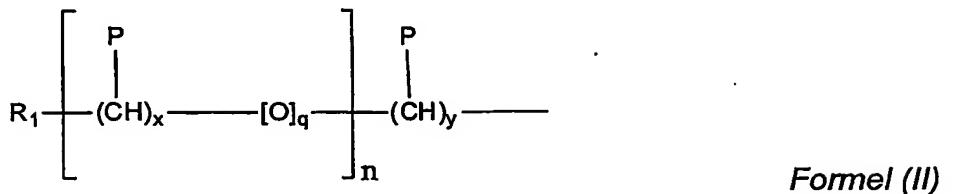


25

miteinander umsetzt, wobei V', W', X' und Z' jeweils unabhängig voneinander einen Kohlenwasserstoffrest darstellen, welcher gegebenenfalls Heteroatome enthalten kann oder/und V', W' oder/und X' Wasserstoff darstellen, wobei wenigstens einer der Reste V', W', X' und Z' eine Bindegruppe Y trägt und wobei die Reste V', W', X' und Z'

30

zusammen mindestens eine Gruppe der Formel (II)



5 aufweisen, worin
 P bei jedem Auftreten unabhängig H, OH, O-R₂ oder CO-R₃ darstellt,
 R₁ H oder ein Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 50 Kohlenstoffatomen ist,
 welcher Heteroatome enthalten kann,
 R₂ bei jedem Auftreten unabhängig einen Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis
 10 6 C-Atomen darstellt,
 R₃ OH oder NR₄R₅ ist,
 R₄ und R₅ jeweils unabhängig H oder einen Kohlenwasserstoffrest,
 welcher Heteroatome enthalten kann, darstellen, wobei R₄ und R₅
 zusammen auch ein Ringsystem bilden können,
 15 n bei jedem Auftreten unabhängig eine ganze Zahl von 1 bis 1000 ist und
 x bei jedem Auftreten eine ganze Zahl von 1 bis 10 ist und
 y eine ganze Zahl von 0 bis 50 darstellt und
 q bei jedem Auftreten unabhängig 0 oder 1 ist.

20 8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass
 wenigstens einer der Reste V', W', X' oder/und Z' mindestens eine
 weitere Funktionalität, ausgewählt aus NH₂, C=O, NC oder/und COOH
 enthält.

25 9. Konjugat, umfassend eine Verbindung der Formel (I), wie in einem der
 Ansprüche 1 bis 6 definiert, kovalent gebunden an einen biopharma-
 zeutischen, pharmazeutischen oder/und synthetischen Wirkstoff.

30 10. Konjugat, umfassend eine Verbindung der Formel (I), wie in einem der
 Ansprüche 1 bis 6 definiert, kovalent gebunden an eine Oberfläche
 oder/und einen Biokatalysator.

11. Konjugat, umfassend eine Verbindung der Formel (I), wie in einem der

Ansprüche 1 bis 6 definiert, kovalent gebunden an ein Enzym.

12. Konjugat umfassend eine Verbindung der Formel (I) wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert kovalent gebunden an Medizinprodukte oder Hilfsmittel zur Darreichung von Wirkstoffen.
5

13. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Konjugat nach Anspruch 9 oder 11.
10

14. Diagnostische Zusammensetzung, umfassend eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder ein Konjugat nach Anspruch 9 oder 10.
15

15. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 9 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebs oder Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Stoffwechselerkrankungen, neuronale bzw. cerebrale Erkrankungen, z.B. Alzheimer oder Parkinson, oder entzündlichen Prozessen, z.B. Infektionen und Immun- oder Autoimmumerkrankungen, insbesondere rheumatoide Arthritis.
20

16. Verfahren zur Herstellung einer Substanzbibliothek, dadurch gekennzeichnet, dass man gemäß dem Verfahren nach Anspruch 7 oder 8 wenigstens zwei verschiedene Verbindungen gemäß Anspruch 1 herstellt.
25

17. Substanzbibliothek, umfassend mindestens zwei unterschiedliche Verbindungen der Formel (I), wie in einem der Ansprüche 1 bis 6 definiert.
30

18. Kit, umfassend
(a) wenigstens eine Verbindung nach einem der Ansprüche 1 bis 6 sowie
(b) Pufferlösungen und gegebenenfalls
(c) Standardproteine oder/und Mittel zur Aufreinigung von Konjugaten, gebildet mit der Verbindung aus (a).
35

Fig: 1

5

10

15

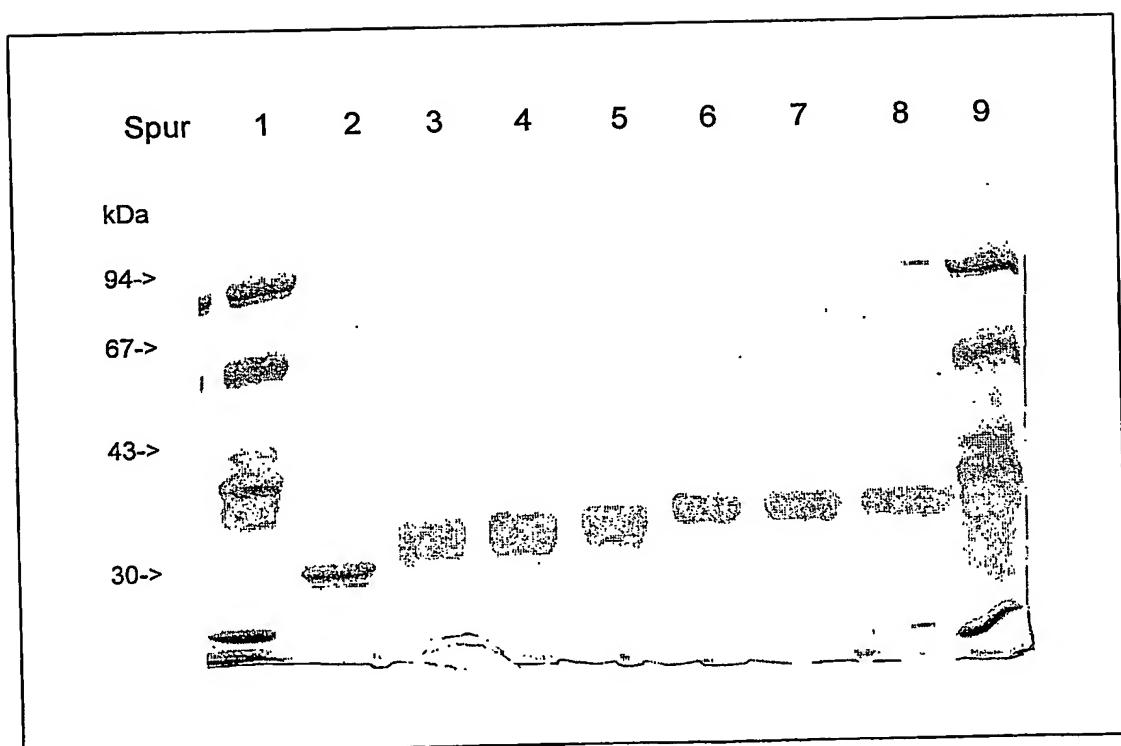
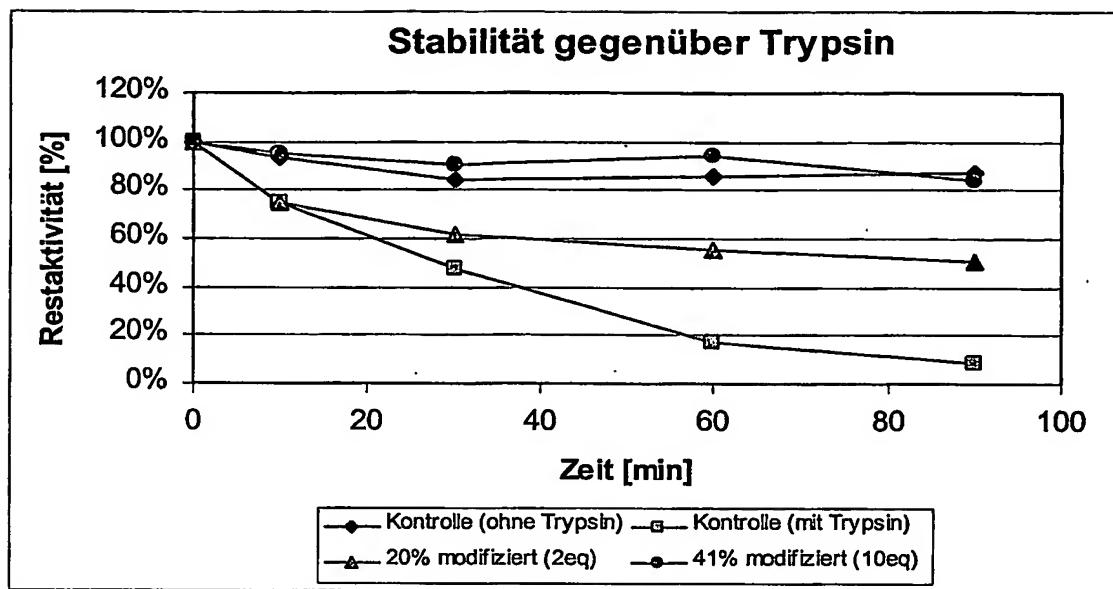
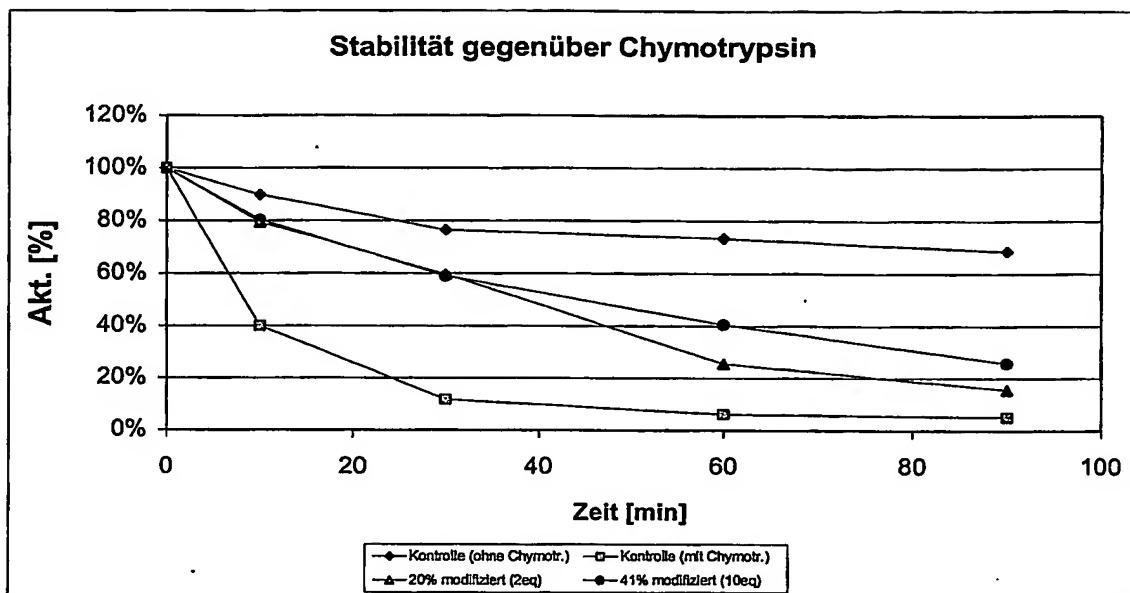


Fig: 2



5

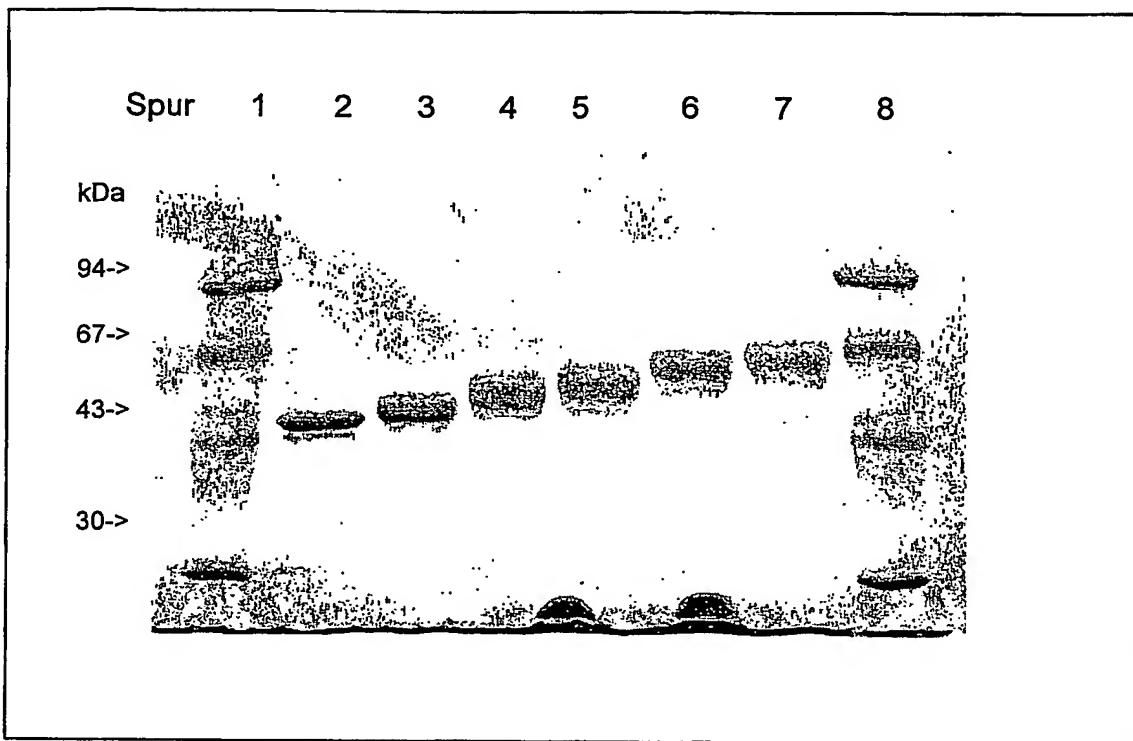
10

Fig: 3

5

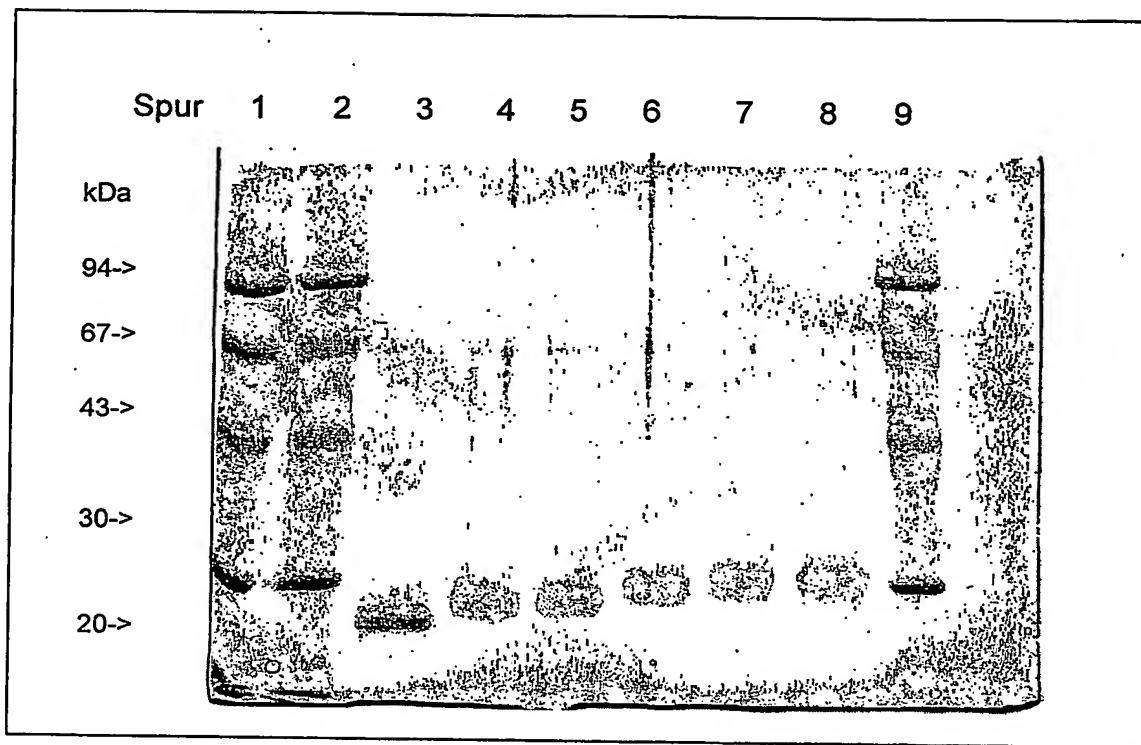
10

4/5

Fig: 4

5

5/5

Fig: 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 7 C07D207/46 C07B61/00 A61K47/48 A61K31/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 7 C07D C07B A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2 881 171 A (HANKINS ELINOR M) 7 April 1959 (1959-04-07) column 1, line 15 - line 32; claims; examples ----- US 3 173 900 A (HANKINS ELINOR M) 16 March 1965 (1965-03-16) column 1, line 10 - line 42; claims; examples ----- -/-	1-5
X		1-5

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

13 December 2004

Date of mailing of the International search report

28/12/2004

Name and mailing address of the ISA
 European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seelmann, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006315

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SHAPIRO S L ET AL: "ALPHA-HYDROXY AMIDES AND RELATED COMPOUNDS" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, vol. 81, 5 December 1959 (1959-12-05), pages 6322-6329, XP002045875 ISSN: 0002-7863 page 6322; table I	1,2,5
X	WO 99/55725 A (DOHERTY ANNETTE MARIAN ; KALTENBRONN JAMES STANLEY (US); LEONARD DANIE) 4 November 1999 (1999-11-04) Schema 1, Seite 20 example 8	1,2,5, 13,14
X,P	WO 03/076490 A (BEIJING JIANKAI TECHNOLOGY CO ; JI SHISHAN (CN); ZHU DEQUAN (CN)) 18 September 2003 (2003-09-18) Verbindungen (11) and (8), Abbildungen 6 und 7 mit auf Seite 3 Ri = H	1-5,13, 14
X	US 2002/107224 A1 (YANAGIYA MASAHIRO ET AL) 8 August 2002 (2002-08-08) insbesondere Seite 39, Verbindung 12; Tabellen 30-31, 34; Beispiele 22, 31-38; Seiten 61-62; Ansprüche the whole document	1-5,9-18
X	WO 01/38561 A (QUESTCOR PHARMACEUTICALS INC) 31 May 2001 (2001-05-31) insbesondere Verbindungen 8 und 14 the whole document	1-18
X	WO 01/12154 A (CATTERALL CATHERINE FIONA ; CELLTECH CHIROSCIENCE LTD (GB); EATON MICH) 22 February 2001 (2001-02-22) insbesondere Verbindungen auf Seiten 32 und 41 the whole document	1-18
X	DE 197 20 165 A (MORPHOCHEM GMBH) 28 January 1999 (1999-01-28) page 1, line 1 - line 5 page 7, line 19 - page 9, line 7 page 11, line 25 - line 40; claims; examples 1,3,6,9,11	1-5,7-18
X	US 6 355 726 B1 (DOEMLING ALEXANDER ET AL) 12 March 2002 (2002-03-12) column 1, line 1 - line 25 column 1, line 55 - column 2, line 27 column 11, line 51 - column 12, line 35 column 13, line 50 - column 14, line 44; claims; examples 1,3,6,9,11	1-5,7-18
		-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006315

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 104 677 A (AVENTIS RES & TECH GMBH & CO) 6 June 2001 (2001-06-06) cited in the application the whole document -----	9-15,18
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310098 Database accession no. 1782002 abstract & BERGMANN ET AL.: CEM.BER., vol. 62, 1929, page 1911, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310099 Database accession no. 1520322 abstract & MIROSHNIKOV ET AL.: JGEN.CHEM.USSR, vol. 40, no. 1, 1970, pages 202-213, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310100 Database accession no. 1717997 abstract & BATTERSBY ET AL.: J.CHEM.SOC., 1955, pages 259-263, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310101 Database accession no. 6726947 abstract & IYER VENKATARAMAN ET AL.: J.INDIAN CHEM.SOC., vol. 59, no. 7, 1982, pages 856-859, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310102 Database accession no. 2438778 abstract & SU 2 039 357 A (MIZRAKH) 1976 -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310103 Database accession no. 1714068 abstract -----	1

-/-

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/006315

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	& STEFICA VALENTEKOVIC ET AL.: CARBOHYDR. RES., vol. 82, 1980, pages 31-44, V. MADISON ET AL.: "Binding affinities and geometries of various metal ligands in peptide deformylase inhibitors" BIOPHYSICAL CHEMISTRY, vol. 101-102, 2002, pages 239-247, XP002310095 figure 1.A	6
X	F. TURPIN ET AL.: "Synthesis of two novel oxocyclam-binding technetium complexes containing an analogue of cocaine" JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS, vol. 45, 2002, pages 379-393, XP002310096 Verbindung 4 auf Seite 382	6
X	A. DÖMLIG UND I. UGI: "multikomponentenreaktionen mit isocyaniden" ANGEW. CHEM., vol. 112, 2000, pages 3300-3344, XP002310097 cited in the application Verbindung 112 page 3337 - page 3339 page 3309 page 3312 - page 3333	1
A		7,16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/006315

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2881171	A	07-04-1959	NONE			
US 3173900	A	16-03-1965	BE FR GB NL	622170 A 1337969 A 1012798 A 282928 A		20-09-1963 08-12-1965
WO 9955725	A	04-11-1999	AT AU AU BR CA DE DE DK EP ES JP NZ PT WO US ZA	259826 T 759492 B2 3358799 A 9909961 A 2322944 A1 69914893 D1 69914893 T2 1076663 T3 1076663 A1 2214021 T3 2002513031 T 507165 A 1076663 T 9955725 A1 6369034 B1 200006035 A		15-03-2004 17-04-2003 16-11-1999 26-12-2000 04-11-1999 25-03-2004 22-07-2004 01-06-2004 21-02-2001 01-09-2004 08-05-2002 30-06-2003 30-06-2004 04-11-1999 09-04-2002 28-01-2002
WO 03076490	A	18-09-2003	WO	03076490 A1		18-09-2003
US 2002107224	A1	08-08-2002	CA CN DE FR GB GB IT JP	2354928 A1 1341595 A 10138935 A1 2812814 A1 2368580 A ,B 2401107 A MI20011777 A1 2002275091 A		11-02-2002 27-03-2002 21-03-2002 15-02-2002 08-05-2002 03-11-2004 11-02-2003 25-09-2002
WO 0138561	A	31-05-2001	AU WO	1929301 A 0138561 A1		04-06-2001 31-05-2001
WO 0112154	A	22-02-2001	AU CA EP WO JP	6461400 A 2379431 A1 1204428 A2 0112154 A2 2003506475 T		13-03-2001 22-02-2001 15-05-2002 22-02-2001 18-02-2003
DE 19720165	A	28-01-1999	DE AU AU CA DE DK WO EP HU JP NO US	19720165 A1 750974 B2 8017598 A 2290614 A1 59810914 D1 983290 T3 9851697 A2 0983290 A1 0002730 A2 2002500643 T 995551 A 6355726 B1		28-01-1999 01-08-2002 08-12-1998 19-11-1998 08-04-2004 14-06-2004 19-11-1998 08-03-2000 28-12-2000 08-01-2002 12-01-2000 12-03-2002
US 6355726	B1	12-03-2002	DE	19720165 A1		28-01-1999

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2004/006315

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
US 6355726	B1	DE	19720216 A1	19-11-1998
		AU	750974 B2	01-08-2002
		AU	8017598 A	08-12-1998
		CA	2290614 A1	19-11-1998
		DE	59810914 D1	08-04-2004
		DK	983290 T3	14-06-2004
		WO	9851697 A2	19-11-1998
		EP	0983290 A1	08-03-2000
		HU	0002730 A2	28-12-2000
		JP	2002500643 T	08-01-2002
		NO	995551 A	12-01-2000
EP 1104677	A	06-06-2001	DE 19957916 A1	07-06-2001
			CA 2327140 A1	01-06-2001
			EP 1104677 A2	06-06-2001
			JP 2001213899 A	07-08-2001
SU 2039357	A	NONE		

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006315

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07D207/46 C07B61/00 A61K47/48 A61K31/40

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07D C07B A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, COMPENDEX, INSPEC, BEILSTEIN Data, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 2 881 171 A (HANKINS ELINOR M) 7. April 1959 (1959-04-07) Spalte 1, Zeile 15 – Zeile 32; Ansprüche; Beispiele -----	1-5
X	US 3 173 900 A (HANKINS ELINOR M) 16. März 1965 (1965-03-16) Spalte 1, Zeile 10 – Zeile 42; Ansprüche; Beispiele ----- -/--	1-5

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldeatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldeatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldeatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

13. Dezember 2004

28/12/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Seelmann, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006315

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Beitr. Anspruch Nr.
X	SHAPIRO S L ET AL: "ALPHA-HYDROXY AMIDES AND RELATED COMPOUNDS" JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 81, 5. Dezember 1959 (1959-12-05), Seiten 6322-6329, XP002045875 ISSN: 0002-7863 Seite 6322; Tabelle I	1,2,5
X	WO 99/55725 A (DOHERTY ANNETTE MARIAN ; KALTENBRONN JAMES STANLEY (US); LEONARD DANIE) 4. November 1999 (1999-11-04) Schema 1, Seite 20 Beispiel 8	1,2,5, 13,14
X,P	WO 03/076490 A (BEIJING JIANKAI TECHNOLOGY CO ; JI SHISHAN (CN); ZHU DEQUAN (CN)) 18. September 2003 (2003-09-18) Verbindungen (11) and (8), Abbildungen 6 und 7 mit auf Seite 3 Ri = H	1-5,13, 14
X	US 2002/107224 A1 (YANAGIYA MASAHIRO ET AL) 8. August 2002 (2002-08-08) insbesondere Seite 39, Verbindung 12; Tabellen 30-31, 34; Beispiele 22, 31-38; Seiten 61-62; Ansprüche das ganze Dokument	1-5,9-18
X	WO 01/38561 A (QUESTCOR PHARMACEUTICALS INC) 31. Mai 2001 (2001-05-31) insbesondere Verbindungen 8 und 14 das ganze Dokument	1-18
X	WO 01/12154 A (CATTERALL CATHERINE FIONA ; CELLTECH CHIROSCIENCE LTD (GB); EATON MICH) 22. Februar 2001 (2001-02-22) insbesondere Verbindungen auf Seiten 32 und 41 das ganze Dokument	1-18
X	DE 197 20 165 A (MORPHOCHEM GMBH) 28. Januar 1999 (1999-01-28) Seite 1, Zeile 1 - Zeile 5 Seite 7, Zeile 19 - Seite 9, Zeile 7 Seite 11, Zeile 25 - Zeile 40; Ansprüche; Beispiele 1,3,6,9,11	1-5,7-18
X	US 6 355 726 B1 (DOEMLING ALEXANDER ET AL) 12. März 2002 (2002-03-12) Spalte 1, Zeile 1 - Zeile 25 Spalte 1, Zeile 55 - Spalte 2, Zeile 27 Spalte 11, Zeile 51 - Spalte 12, Zeile 35 Spalte 13, Zeile 50 - Spalte 14, Zeile 44; Ansprüche; Beispiele 1,3,6,9,11	1-5,7-18
	-/-	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/006315

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 1 104 677 A (AVENTIS RES & TECH GMBH & CO) 6. Juni 2001 (2001-06-06) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	9-15,18
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310098 Database accession no. 1782002 Zusammenfassung & BERGMANN ET AL.: CHEM. BER., Bd. 62, 1929, Seite 1911, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310099 Database accession no. 1520322 Zusammenfassung & MIROSHNIKOV ET AL.: JGEN.CHEM.USSR, Bd. 40, Nr. 1, 1970, Seiten 202-213, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310100 Database accession no. 1717997 Zusammenfassung & BATTERSBY ET AL.: J.CHEM.SOC., 1955, Seiten 259-263, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310101 Database accession no. 6726947 Zusammenfassung & IYER VENKATARAMAN ET AL.: J.INDIAN CHEM.SOC., Bd. 59, Nr. 7, 1982, Seiten 856-859, -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310102 Database accession no. 2438778 Zusammenfassung & SU 2 039 357 A (MIZRAKH) 1976 -----	1
X	DATABASE BEILSTEIN BEILSTEIN INSTITUTE FOR ORGANIC CHEMISTRY, FRANKFURT-MAIN, DE; XP002310103 Database accession no. 1714068 Zusammenfassung -----	1

-/-

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006315

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	& STEFICA VALENTEKOVIC ET AL.: CARBOHYDR. RES., Bd. 82, 1980, Seiten 31-44, -----	
X	V. MADISON ET AL.: "Binding affinities and geometries of various metal ligands in peptide deformylase inhibitors" BIOPHYSICAL CHEMISTRY, Bd. 101-102, 2002, Seiten 239-247, XP002310095 Abbildung 1.A -----	6
X	F. TURPIN ET AL.: "Synthesis of two novel oxocyclam-binding technetium complexes containing an analogue of cocaine" JOURNAL OF LABELLED COMPOUNDS AND RADIOPHARMACEUTICALS, Bd. 45, 2002, Seiten 379-393, XP002310096 Verbindung 4 auf Seite 382 -----	6
X	A. DÖMLIG UND I. UGI: "multikomponentenreaktionen mit isocyaniden" ANGEW. CHEM., Bd. 112, 2000, Seiten 3300-3344, XP002310097 in der Anmeldung erwähnt Verbindung 112 Seite 3337 - Seite 3339 Seite 3309 Seite 3312 - Seite 3333 -----	1
A		7,16,17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006315

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
US 2881171	A	07-04-1959		KEINE		
US 3173900	A	16-03-1965		BE 622170 A FR 1337969 A GB 1012798 A NL 282928 A		20-09-1963 08-12-1965
WO 9955725	A	04-11-1999		AT 259826 T AU 759492 B2 AU 3358799 A BR 9909961 A CA 2322944 A1 DE 69914893 D1 DE 69914893 T2 DK 1076663 T3 EP 1076663 A1 ES 2214021 T3 JP 2002513031 T NZ 507165 A PT 1076663 T WO 9955725 A1 US 6369034 B1 ZA 200006035 A		15-03-2004 17-04-2003 16-11-1999 26-12-2000 04-11-1999 25-03-2004 22-07-2004 01-06-2004 21-02-2001 01-09-2004 08-05-2002 30-06-2003 30-06-2004 04-11-1999 09-04-2002 28-01-2002
WO 03076490	A	18-09-2003	WO	03076490 A1		18-09-2003
US 2002107224	A1	08-08-2002		CA 2354928 A1 CN 1341595 A DE 10138935 A1 FR 2812814 A1 GB 2368580 A ,B GB 2401107 A IT MI20011777 A1 JP 2002275091 A		11-02-2002 27-03-2002 21-03-2002 15-02-2002 08-05-2002 03-11-2004 11-02-2003 25-09-2002
WO 0138561	A	31-05-2001	AU WO	1929301 A 0138561 A1		04-06-2001 31-05-2001
WO 0112154	A	22-02-2001	AU CA EP WO JP	6461400 A 2379431 A1 1204428 A2 0112154 A2 2003506475 T		13-03-2001 22-02-2001 15-05-2002 22-02-2001 18-02-2003
DE 19720165	A	28-01-1999	DE AU AU CA DE DK WO EP HU JP NO US	19720165 A1 750974 B2 8017598 A 2290614 A1 59810914 D1 983290 T3 9851697 A2 0983290 A1 0002730 A2 2002500643 T 995551 A 6355726 B1		28-01-1999 01-08-2002 08-12-1998 19-11-1998 08-04-2004 14-06-2004 19-11-1998 08-03-2000 28-12-2000 08-01-2002 12-01-2000 12-03-2002
US 6355726	B1	12-03-2002	DE	19720165 A1		28-01-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/006315

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6355726	B1	DE 19720216 A1 AU 750974 B2 AU 8017598 A CA 2290614 A1 DE 59810914 D1 DK 983290 T3 WO 9851697 A2 EP 0983290 A1 HU 0002730 A2 JP 2002500643 T NO 995551 A	19-11-1998 01-08-2002 08-12-1998 19-11-1998 08-04-2004 14-06-2004 19-11-1998 08-03-2000 28-12-2000 08-01-2002 12-01-2000
EP 1104677	A 06-06-2001	DE 19957916 A1 CA 2327140 A1 EP 1104677 A2 JP 2001213899 A	07-06-2001 01-06-2001 06-06-2001 07-08-2001
SU 2039357	A	KEINE	